PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

WO 98/59040 (51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **A2** C12N 9/00 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Dezember 1998 (30.12.98)

PCT/EP98/03468 (21) Internationales Aktenzeichen:

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Juni 1998 (09.06.98)

(30) Prioritätsdaten:

DE 20. Juni 1997 (20.06.97) 197 26 329.1 26. März 1998 (26.03.98) DE 198 13 274.3 14. April 1998 (14.04.98) DE 198 16 496.3

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAGEN, Gustav [DE/DE]; Walter-Flex-Strasse 32, D-51373 Leverkusen (DE). SIEG-MUND, Hans-Ulrich [DE/DE]; Quettinger Strasse 167, D-51381 Leverkusen (DE). WEICHEL, Walter [DE/DE]; Dhünner Aue 15, D-51519 Odenthal (DE). WICK, Maresa [DE/DE]; Andreas-Gryphius-Strasse 26, D-51065 Köln (DE). ZUBOV, Dmitry [RU/DE]; Roggendorfstrasse 59, D-51061 Köln (DE).

AKTIENGE-(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER SELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: HUMAN CATALYTIC TELOMERASE SUB-UNIT AND ITS DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE

(54) Bezeichnung: HUMANE KATALYTISCHE TELOMERASE-UNTEREINHEIT UND DEREN DIAGNOSTISCHE UND THERA-PEUTISCHE VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to the nucleotide sequence and the protein sequence derived therefrom, which encodes for the human catalytic telomerase sub-unit. The invention furthermore relates to methods involving a pharmaceutical, diagnostic or therapeutic use of this gene/protein, principally for treating cancer and ageing.

(57) Zusammenfassung

Diese Erfindung betrifft die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Proteinsequenz, die für die humane katalytische Telomerase-Untereinheit codiert. Darüberhinaus betrifft diese Erfindung Methoden, die eine pharmazeutische, diagnostische oder therapeutische Verwendung von diesem Gen/Protein beinhaltet, vor allem in der Behandlung von Krebs und Alterung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

					•	SI	Slowenien
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SK	Slowakei
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen		
AΤ	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
		IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CA	Kanada	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo		•	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	PL	Polen		
CM	Kamerun		Korea				
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

Aufbau und Funktion der Chromosomenenden

Das genetische Material eukaryontischer Zellen ist auf linearen Chromosomen verteilt. Die Enden der Erbanlagen werden, abgeleitet von den griechischen Wörtern telos (Ende) und meros (Teil, Segment), als Telomere bezeichnet. Die meisten Telomere bestehen aus Wiederholungen von kurzen Sequenzen, die überwiegend aus Thymin und Guanin aufgebaut sind (Zakian, 1995). Die Telomersequenzen verwandter Organismen sind oft ähnlich und sogar zwischen phyllogenetisch weiter entfernten Spezies konserviert. Bemerkenswert ist, daß in allen bislang untersuchten Wirbeltieren die Telomere aus der Sequenz TTAGGG aufgebaut werden (Meyne et al., 1989).

15

5

10

Die Telomere üben verschiedene wichtige Funktionen aus. Sie verhindern die Fusion von Chromosomen (McClintock, 1941) und damit die Entstehung von dizentrischen Erbanlagen. Solche Chromosomen mit zwei Centromeren können durch Verlust der Heterozygotie bzw. Verdopplung oder Verlust von Genen zur Entwicklung von Krebs führen.

20

Desweiteren dienen Telomere dazu, intakte Erbanlagen von beschädigten zu unterscheiden. So stellten Hefezellen ihre Zellteilung ein, wenn sie ein Chromosom ohne Telomer enthielten (Sandell und Zakian, 1993).

30

25

Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllen Telomere bei der DNA-Replikation eukaryontischer Zellen. Im Gegensatz zu den zirkulären Genomen von Prokaryonten können die linearen Chromosomen der Eukaryonten von dem DNA Polymerase-Komplex nicht vollständig repliziert werden. Zur Initiation der DNA-Replikation sind RNA-Primer notwendig. Nach Abspaltung der RNA-Primer, Verlängerung der Okazaki-Fragmente und anschließender Ligation fehlt dem neu-synthetisierten DNA-Strang das 5'-Ende, denn dort kann der RNA-Primer nicht durch DNA ersetzt werden. Ohne besondere Schutzmechanismen würden daher die Chromosomen mit jeder Zellteilung schrumpfen ("end-replication problem";

Harley et al., 1990). Die nicht-kodierenden Telomersequenzen stellen vermutlich eine Pufferzone dar, um dem Verlust von Genen vorzubeugen (Sandell und Zakian, 1993).

Darüberhinaus spielen Telomere auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Alterung (Olovnikov, 1973). Humane somatische Zellen zeigen in Kultur eine limitierte Replikationskapazität; sie werden nach einer gewissen Zeit seneszent. In diesem Zustand teilen sich die Zellen selbst nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren nicht mehr, sterben aber nicht, sondern bleiben metabolisch aktiv (Goldstein, 1990). Verschiedene Beobachtungen sprechen für die Hypothese, daß eine Zelle anhand der Länge ihrer Telomere bestimmt, wie oft sie sich noch teilen kann (Allsopp et al., 1992).

Zusammenfassend besitzen die Telomere somit zentrale Funktionen bei der Alterung von Zellen sowie der Stabilisierung des genetischen Materials und Verhinderung von Krebs.

15 Das Enzym Telomerase synthetisiert die Telomere

Wie oben beschrieben können Organismen mit linearen Chromosomen ohne einen speziellen Schutzmechanismus ihr Genom nur unvollständig replizieren. Die meisten Eukaryonten verwenden zur Regeneration der Telomersequenzen ein spezielles Enzym, die Telomerase. In den bislang untersuchten Einzellern wird Telomerase konstitutiv expremiert. Dagegen wurde in Menschen die Telomerase-Aktivität nur in Keimzellen und Tumorzellen gemessen, wogegen benachbartes somatisches Gewebe keine Telomerase enthielt (Kim et al., 1994).

Telomerase in Ciliaten

25

30

20

5

10

Die Telomerase wurde, wie auch die Telomere, zuerst im Ciliaten Tetrahymena thermophila identifiziert. Die Telomerase-Aktivität wurde durch Verlängerung des einzelsträngigen Oligonukleotides d(TTGGGG)4 in Gegenwart von dTTP und dGTP nachgewiesen (Greider und Blackburn, 1985). Dabei wurde an den Primer wiederholt die Tetrahymena-Telomersequenz TTGGGG angehängt. Selbst wenn als Ausgangsmaterial ein Oligonukleotid mit der unregelmäßigen Telomersequenz von Saccharomyces cerevisiae, T(G)1-3, angeboten wurde, verlängerte die Telomerase den Primer mit der Telomersequenz

von Tetrahymena (Greider und Blackburn, 1985). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Telomerase selbst die Vorlage für die Sequenz der Telomere mit sich führt.

Nachdem zunächst die Existenz einer RNA-Komponente in der Telomerase nachgewiesen werden konnte (Greider und Blackburn, 1987), wurde kurze Zeit später das Gen für die RNA-Untereinheit der Telomerase kloniert (Greider und Blackburn, 1989). Diese RNA enthält eine Region mit dem Komplement zur Telomersequenz von *Tetrahymena* (nachfolgend "Komplement-Region" genannt). Die Telomerase-Aktivität war abhängig von der RNA-Komponente, was durch Verdau der RNA mit nachfolgendem Verlust der Aktivität gezeigt werden konnte. Wurde die Telomerase-RNA in ihrer Komplement-Region mutiert, so wurden die entsprechenden Mutationen *in vivo* in die Telomere von *Tetrahymena* eingebaut (Yu *et al.*, 1990). Die Telomerase gehört demnach zur Klasse der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen.

15

20

25

10

5

Die ersten Protein-Untereinheiten der *Tetrahymena*-Telomerase, p80 und p95, wurden 1995 identifiziert (Collins *et al.*, 1995). Die Beobachtung, daß p95 das Enzym an der DNA verankert und p80 die RNA-Komponente bindet, führte zu folgendem Modell: Die Telomerase-RNA lagert sich mit ihrer Komplement-Region an den einzelsträngigen 3'-Überhang an. Die Verlängerung des 3'-Überhangs geschieht durch Einbau der entsprechenden Nukleotide in 5'-3'-Richtung. Die *de novo*-Synthese von Telomeren beinhaltet wahrscheinlich einen Elongations- und einen Translokationsschritt. Ist eine Telomersequenz synthetisiert worden, bewegt sich die Telomerase vermutlich an der DNA entlang, bis sie wieder in einer Position ist, um eine vollständige Telomersequenz hinzuzufügen. Dieses Modell muß nicht allgemeingültig sein, denn zwischen Telomerasen unterschiedlicher Spezies bestehen große Unterschiede in der Anzahl der Nukleotide, die das Enzym addiert bevor es vom Telomer dissoziiert (Prowse *et al.*, 1993).

30

Darüberhinaus wurden kürzlich auch Telomerase-Untereinheiten anderer Organismen identifiziert. In dem Ciliaten *Euplotes aediculatus* wurden zwei Protein-Untereinheiten, p123 und p43, gefunden, welche keine Homologie zu den *Tetrahymena*-Telomerase-Proteinen zeigen. Die Telomerase-Untereinheit p123 weist an ihrem N-Terminus eine

basische Domäne und am C-Terminus eine Domäne für eine Reverse Transkriptase (RT) auf, was auf eine katalytische Funktion dieses Proteins hindeutet (Lingner et al., 1997). Darüberhinaus wurde eine signifikante Homologie von p123 zu dem von Lundblad gefundenen Protein Est2 aus Saccharomyces cerevisiae beschrieben (Lingner et al., 1997).

5

10

15

20

Während für p80 und p95 bisher keine essentielle Funktion für die Telomeraseaktivität nachgewiesen wurde, konnte für die potentiellen katalytischen Untereinheiten der Telomerase p123/est2p eindeutig eine Schlüsselfunktion aufgezeigt werden: Eine Mutation des RT-Aktivitätzentrums von est2p führte zu einer signifikanten Verkürzung der Telomere in Hefezellen (Lingner et al., 1997).

Telomerase-Komponenten aus Säugerzellen

Inzwischen wurden die RNA-Komponenten der Telomerasen von verschiedenen Organismen, unter anderem von Saccharomyces cerevisiae, Mäusen und Menschen (Singer und Gottschling, 1994; Blasco et al., 1996; Feng et al., 1995), kloniert. Alle bislang bekannten Telomerase-RNAs enthalten eine Region, die komplementär zu der Telomersequenz des jeweiligen Organismus ist. Die Primärsequenz der humanen Telomerase-RNA (hTR) weist jedoch keine Ähnlichkeiten mit den RNA-Komponenten der Ciliaten oder Saccharomyces cerevisiae auf. Dagegen existieren konservierte Bereiche zwischen der humanen und der murinen Telomerase-RNA (Feng et al., 1995).

25

30

Vor kurzem wurde die Isolation eines humanen Telomerase-assoziertes Proteins (hTP1) beschrieben (Harrington et al., 1997). Das korrespondierende Gen wurde aufgrund seiner Homologie zu der Tetrahymena Telomerase Untereinheit p80 in einer nicht der Allgemeinheit zugänglichen EST Datenbank gefunden (Harrington et al., 1997). hTP1 ist aus 2627 Aminosäuren zusammengesetzt und zeigt im N-Teminus drei Domänen, welche maximal zu 46% homolog zu p80 sind. Als weiteres Strukturelement konnten im C-terminalen Bereich 16 Wiederholungen aus den Aminosäuren Tryptophan und Asparagin aufgezeigt werden, die vermutlich eine Protein-Protein Interaktion vermitteln.

Aktivierung der Telomerase in menschlichen Tumoren

Eine Aktivität der Telomerase konnte in Menschen ursprünglich nur in Keimbahnzellen, nicht aber in normalen somatischen Zellen (Hastie et al., 1990; Kim et al., 1994) nachgewiesen werden. Nach der Entwicklung eines sensitiveren Nachweisverfahrens (Kim et al., 1994) wurde auch in hematopoietischen Zellen eine geringe Telomeraseaktivität detektiert (Broccoli et al., 1995; Counter et al., 1995; Hiyama et al., 1995). Allerdings wiesen diese Zellen trotzdem eine Reduktion der Telomere auf (Vaziri et al., 1994; Counter et al., 1995). Noch ist nicht geklärt, ob die Menge an Enzym in diesen Zellen nicht ausreichend für eine Kompensation des Telomerverlustes ist, oder ob die gemessene Telomerase-Aktivität von einer Subpopulation, z.B. unvollständig ausdifferenzierten CD34⁺38⁺-Vorläuferzellen, herrührt (Hiyama et al., 1995). Zur Klärung wäre ein Nachweis der Telomerase-Aktivität in einer einzelnen Zelle nötig.

Interessanterweise wurde jedoch in einer großen Zahl der bislang getesteten Tumorgeweben eine signifikante Telomerase-Aktivität nachgewiesen (1734/2031, 85%; Shay, 1997), während in normalem somatischen Gewebe keine Aktivität gefunden wurde (1/196, <1%, Shay, 1997). Verschiedene Untersuchungen zeigten außerdem, daß in seneszenten Zellen, die mit viralen Oncoproteinen transformiert wurden, die Telomere weiterhin schrumpften und Telomerase nur in der Subpopulation entdeckt werden konnte, die die Wachstumskrise überlebte (Counter et al., 1992). In diesen immortalisierten Zellen waren auch die Telomere stabil (Counter et al., 1992). Ähnliche Befunde aus Untersuchungen an Mäusen (Blasco et al., 1996) stützen die Annahme, daß eine Reaktivierung der Telomerase ein spätes Ereignis in der Tumorgenese ist.

25

30

5

10

15

20

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine "Telomerase-Hypothese" entwickelt, die den Verlust von Telomersequenzen und Zellalterung mit der Aktivität von Telomerase und der Entstehung von Krebs verbindet. In langlebigen Spezies wie dem Menschen kann das Schrumpfen der Telomere als ein Mechanismus zur Tumorsuppression angesehen werden. Ausdifferenzierte Zellen, die keine Telomerase enthalten, stellen bei einer bestimmten Länge der Telomere ihre Zellteilung ein. Mutiert eine solche Zelle, so kann aus ihr nur dann ein Tumor entstehen, wenn die Zelle ihre Telomere verlängern kann. Ansonsten würde die Zelle

10

15

weiterhin Telomersequenzen verlieren, bis ihre Chromsomen instabil werden und sie schließlich zugrunde geht. Die Reaktivierung der Telomerase ist vermutlich der Hauptmechanismus von Tumorzellen zur Stabilisation ihrer Telomere.

- Aus diesen Beobachtungen und Überlegungen ergibt sich, daß eine Inhibition der Telomerase eine Therapie von Tumoren erlauben sollte. Konventionelle Krebstherapien mit Zytostatika oder kurzwelligen Strahlen schädigen nicht nur die Tumorzellen, sondern alle sich teilenden Zellen des Körpers. Da aber außer Tumorzellen nur Keimbahnzellen eine signifikante Telomerase-Aktivität enthalten, würden Telomerase-Inhibitoren spezifischer die Tumorzellen angreifen und somit weniger unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. In allen bislang getesteten Tumorgeweben wurde eine Telomerase-Aktivität nachgewiesen, so daß diese Therapeutika gegen alle Krebsarten eingesetzt werden könnten. Die Wirkung von Telomerase-Inhibitoren würde dann eintreten, wenn die Telomere der Zellen sich soweit verkürzt haben, daß das Genom instabil wird. Da Tumorzellen meist kürzere Telomere aufweisen als normale somatische Zellen, würden zuerst Krebszellen durch Telomerase-Inhibitoren eliminiert werden. Zellen mit langen Telomeren, wie die Keimzellen, würden dagegen erst viel später geschädigt werden. Telomerase-Inhibitoren stellen somit einen zukunftsweisenden Weg für die Therapierung von Krebs dar.
- Eindeutige Antworten auf die Frage nach der Art und den Angriffspunkten physiologischer Telomerase-Inhibitoren werden aber erst möglich sein, wenn auch die Proteinstrukturen des Enzyms mit ihren Funktionen identifiziert und die Erkenntnisse über verschiedene Telomerbindende Proteine vertieft sind.
- Die Erfindung betrifft die katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit (phTC) gegebenenfalls in aufgereinigter Form, aktive Teile des Proteins, Modulatoren, insbesondere Agonisten des Proteins, die Funktion des Proteins imitierende Substanzen sowie Kombinationen aus diesen Komponenten.

Die Erfindung betrifft weiterhin:

Die Nucleinsäuresequenz, die für das humane Protein phTC kodiert, im einzelnen: die genomische Sequenz des hTC-Gens, 5 die cDNA-Sequenz des hTC-Gens, die DNA-Sequenz von hTC-Varianten die Sequenz der mRNA, die vom hTC Gen transkribiert wird, Teile aus den oben genannten Sequenzen, darunter die in der Fig. 1 gezeigte DNA Sequenz (SEQ ID No. 1) von hTC. 10 Die Nucleinsäuresequenzen, die in anderen Säugern für dem hTC homologe Proteine kodieren, im einzelnen: die genomischen Sequenzen hTC-homologer Gene, 15 die cDNA-Sequenzen hTC-homologer Gene, die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-homologen Genen transkribiert werden, Teile aus den oben genannten Sequenzen. 20 Nucleinsäuresequenzen, die für dem Protein phTC verwandte Proteine im Menschen und anderen Säugern kodieren, im einzelnen: die genomischen Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen 25 die cDNA-Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen Säugern, die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-verwandten Genen transkribiert werden in Mensch und anderen Säugern,

Teile aus den oben genannten Sequenzen.

20

25

30

- Das oben beschriebene phTC Protein, isoliert aus Säugerzellen (vgl. Fig. 2 und SEQ ID No. 2).
- Das phTC Protein, markiert mit einem Nachweis-Reagenz, wobei das NachweisReagenz bevorzugt ein Enzym, ein radioaktiv markiertes Element oder eine fluoreszierende Chemikalie ist.
 - Einen Antikörper, der gegen das phTC Protein gerichtet ist.
- 10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein polyklonaler Antikörper.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist dies ein monoklonaler Antikörper.

Solche Antikörper können beispielsweise produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörper-Produktion effektiven Menge eines phTC Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers.

Weiterhin läßt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zellinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert.

Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein.

Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin.

Oligonukleotide in aufgereinigter Form mit einer Sequenz, die identisch oder exakt komplementär ist zu einer 10 bis 500 Nukleotide langen, zusammenhängenden Sequenz der oben beschriebenen genomischen DNA, cDNA oder mRNA.

Ein solches Oligonukleotid kann insbesondere ein Oligodesoxyribonucleotid oder ein Oligoribonucleotid oder eine Peptidnukleotidsäure (PNA) sein

Bevorzugt sind Oligonukleotide, welche die Aktivität der Telomerase inhibieren, reprimieren oder blockieren, wenn sie an die hTC mRNA binden.

10

5

Eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz, die das Protein phTC oder ein Fragment dieses Proteins kodiert, gegebenenfalls enthaltend die DNA Sequenz aus Abbildung 1, oder DNA Sequenz, die mit der vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

15

Ein rekombinantes DNA Molekül, das eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz beinhaltet, die phTC oder ein Fragment von phTC kodiert, wobei letztere Sequenz bevorzugt die DNA Sequenz aus Abbildung 1 enthält, oder das eine solche DNA Sequenz beinhaltet, die mit der vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

20

Bevorzugt ist in dem oben genannten rekombinanten DNA Molekül die beschriebene DNA mit einer Expressions-Kontrollsequenz verbunden.

25

30

Besonders bevorzugt als Expressions-Kontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40- oder Adenovirus, das lac System, das trp System, das TAC System, das TRC System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen λ , die Kontrollregionen des fd Hüllproteins, der Promotor der 3-Phospoglycerat Kinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des α -Mating Faktors der Hefe.

Einen einzelligen Wirt, der mit einem oben beschriebenen rekombinanten DNA Molekül transformiert wurde, das die DNA Sequenz oder eine degenerierte Variante dieser Sequenz enthält, die für das phTC Protein oder einen Teil dieses Protein kodiert. In diesem rekombinanten DNA-Molekül ist die besagte DNA Sequenz mit einer Expressions-Kontrollsequenz verknüpft.

Bevorzugte Beispiele für den einzelligen Wirt sind: E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, yeasts, CHO, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 und BMT10 Zellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen in Zellkultur.

10

5

- Einen rekombinanten Virus, der mit einem der vorstehend beschriebenen DNA Moleküle oder einem Derivat oder Fragment dieses Moleküls transformiert wird.
- Eine Methode zur Inhibition der Telomeraseaktivität in humanen Zellen, bevorzugt neoplastische Zellen, bei der ein exogenes Polynukleotid in die Zellen transferiert wird, das aus einer Transkriptionseinheit besteht. Diese Transkriptionseinheit beinhaltet eine Polynukleotidsequenz aus mindestens 29 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.

Bevorzugt enthält die oben genannte heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor, der in humanen Zellen konstitutiv aktiv ist.

25

30

Alternativ kann die heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor enthalten, der in humanen Zellen durch Zugabe einer regulatorischen Substanz induziert oder reprimiert werden kann. Dazu zählen beispielsweise induzierbare und reprimierbare Tetrazyklin-abhängige Promotoren, Heatshock-Promotoren, Metallionen-abhängige Promotoren.

30

Das obengenannte exogene Polynukleotid kann beispielsweise ein virales Genom mit einer Transkriptionseinheit aus der humanen hTC DNA-Komponente sein.

Besonders bevorzugt produziert die besagte Transkriptionseinheit antisense RNA, die substantiell komplementär zur humanen hTC RNA-Komponente ist.

Weiterhin besonders bevorzugt kann das exogene Polynukleotid die Sequenz aus Abb. 1 enthalten.

- Dieses

 Polynukleotid für die Gentherapie einer menschlichen Krankheit. Dieses Polynukleotid besteht aus einer Transkriptionseinheit, die eine Polynukleotidsequenz aus mindestens 9 aufeinanderfolgenden Nukleotiden enthält, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.
 - Eine Methode zur Detektion Telomerase-assoziierter Zustände in einem Patienten, die folgende Schritte umfaßt:
- 20 A. Detektion des phTC Proteins in Körperflüssigkeiten oder zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
 - B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in standardisierten normalen Zellen oder Körperflüssigkeiten des gleichen Typs wie die Testprobe;
- 25 C. Detektion diagnostischer Werte, die höher oder niedriger als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen Telomerase-assoziierten Zustand, der wiederum einen pathogenen Zustand indiziert.

Bevorzugt wird diese Methode eingesetzt zur Detektion einer neoplastischen Erkrankung eines Patienten. Die Methode umfaßt dann folgende Schritte:

10

15

20

25

30

- A. Detektion des phTC Proteins in zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
- B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in nicht-neoplastischen Zellen des gleichen Typs wie die Testprobe;
- C. Diagnostische Werte, die deutlich höher als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen neoplastischen Zustand.
- Eine Methode zur Bestimmung der Gegenwart des phTC Proteins in einer Zelle oder zellulären Probe, die auf der Amplifikation eines hTC-Polynukleotids oder Hybridisierung eines hTC-Polynukleotids, Primers oder einer hTC komplementären Sequenz mit einem hTC Polynukleotid beruhen.
- Ein Testkit zum Nachweis von phTC in zellulären Proben und Körperflüssigkeiten, wobei markierte, immunchemisch-reaktive Komponenten beispielsweise sein können: polyklonale Antikörper gegen phTC, monoklonale Antikörper gegen phTC, Fragmente dieser Antikörper oder einem Gemisch aus diesen Komponenten.
 - Eine Methode zur Verhinderung und/oder Behandlung zellulärer (Zer-) Störung und/oder Fehlfunktion und/oder anderer Krankheitsbilder im Menschen, die auf der Gabe einer therapeutisch effektiven Menge an katalytisch aktiver humaner Telomerase, ihrer funktionellen Äquivalente oder ihrer katalytisch aktiven Fragmente beruht. Ebenfalls denkbar ist der Einsatz einer Substanz, die die Produktion und/oder Aktivität von phTC fördert; eine Substanz, die die Aktivität von phTC imitieren kann; einer Substanz, die die Produktion und/oder Aktivität von phTC inhibieren kann oder eines Gemisches dieser Substanzen. Weiterhin kann ein spezifischer Bindungspartner eingesetzt werden.

Bevorzugt wird die Methode eingesetzt zur Verhinderung oder Behandlung der Alterung oder von Krebserkrankungen.

Substanzen, die die Aktivität von phTC beeinflussen, d.h. inhibieren oder fördern, können, werden hier als Modulatoren bezeichnet. Solche Modulatoren können in an

15

20

sich bekannter Weise gefunden werden, wenn man in einem Telomerase-Assay ihren Einfluß auf die Telomerase-Aktivität prüft. Beispiele für Telomerase-Assays sind im Rahmen von Beispiel 15 angegeben.

Modulatoren der phTC sind interessant zur Behandlung von Krankheiten, die mit Telomerase in Zusammenhang stehen. Insbesondere seien hier die Verhinderung oder Behandlung von Alterungsprozessen oder von Krebserkrankungen genannt.

- Eine antisense-Nukleinsäure gegen die hTC mRNA, die eine Nukleotidsequenz enthält, die mit besagter mRNA hybridisiert, wobei die antisense-Nukleinsäure eine RNA oder eine DNA ist.

Bevorzugt bindet die antisense-Nukleinsäure an das Start-Kodon der jeweiligen mRNAs.

 Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, von der bei der Transkription eine antisense-Ribonukleinsäure gegen die hTC mRNA produziert wird. Diese besagte antisense-Ribonukleinsäure enthält eine Nukleinsäuresequenz,

die mit der besagten hTC mRNA hybridisieren kann.

Ein solches DNA-Molekül kann zur Herstellung einer Zellinie mit reduzierter Expression von phTC eingesetzt werden, indem man eine phTC-produzierende Zellinie mit diesem rekombinanten DNA Molekül transfiziert.

25 - Ein Ribozym, das die hTC mRNA spaltet.

Bevorzugt ist dies ein Tetrahymena-Typ Ribozym oder ein Hammerhead-Typ Ribozym.

Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, deren Transkription zur Produktion eines solchen Ribozyms führt.

20

Dieses rekombinante DNA-Molekül kann eingesetzt werden um eine phTC-produzierende Zellinie zu transfizieren.

- Eine Zusammenstellung, bestehend aus einem Paar von humanen hTC Polynukleotid-PCR Primern, wobei die Primer bevorzugt aus Sequenzen bestehen, die mit der Sequenz der humanen hTC mRNA korrespondieren oder zu dieser Sequenz komplementär sind.
- Eine Zusammenstellung, die eine Polynukleotid-Hybridisierungssonde für das humane hTC Gen enthält, wobei die Sonde bevorzugt mindestens 29 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die mit der Sequenz des humanen hTC Gens korrespondieren oder zu dieser komplementär sind.
- Tiermodelle, mit denen die Telomerase/Telomer-Regulation in vivo untersucht werden kann. So können z.B. mit Knockout- oder transgenen Tieren Tumorentstehung und Alterung direkt untersucht werden.

Funktionelle Äquivalente sind im Fall von Proteinen oder Peptiden solche Verbindungen, die sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz unterscheiden können, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

Bekannte Beispiele hierfür sind Isoenzyme bzw. sogenannte Mikroheterogenitäten bei Proteinen.

- Im Fall der Oligo- oder Polynucleinsäuren sollten unter funktionellen Äquivalenten solche Verbindungen verstanden werden, die sich in der Nucleotid-Sequenz unterscheiden, aber für das selbe Protein codieren. Dies ist z.B. auf den degenerierten genetischen Code zurückzuführen.
- 30 Erläuterung der Abbildungen:

15

20

25

30

- Fig. 1: cDNA Sequenz der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit (hTC) (SEQ ID No. 1).
- Fig. 2: Abgeleitete Aminosäuresequenz von der in Fig.1 dargestellten hTC DNA Sequenz (SEQ ID No. 2).

Die in Fig. 1 dargestellte DNA Sequenz läßt sich von Position 64 bis Position 3461 vollständig in eine Aminosäuresequenz translatieren. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt.

Fig. 3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit unterschiedlich vorbehandelter DNA von AA281296.

Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes 0,8%iges Agarosegel. In den Spuren 1 und 8 sind zwei verschiedene DNA Größenstandards aufgetragen, wobei die DNA Fragmentlängen 3, 2, 0.5 und 0.4 kb hervorgehoben sind. Die AA281296 DNA in pT7T3D wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI /Not I (Spur 3), Pst I (Spur 6) und Xho 1 (Spur 7) verdaut. Auf die Spur 2 wurde unverdaute DNA von AA281296 in pT7T3D aufgetragen. In den Spuren 4 und 5 wurde 1/10 eines PCR-Ansatzes (1 Minute 94°C, 2 Minuten 60°C, 3 Minuten 72°C) mit der hTC cDNA in pT7T3D und den Primern 1 (5' GAGTGTGTACGTC-GTCGAGCTGCTCAGGTC 3') und 4 (5' CACCCTCGAGGTGAGACGCTCGGCC 3') [Spur 4] bzw. mit den Primern 6 (5' GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAACAGTG 3') und 7 (5' GCCAAGTTCCTGCACTGGCTGATGAG 3') [Spur 5] appliziert.

Fig. 4: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123) und Mensch (phTC).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen p123 von Euplotes aediculatus und dem identifizierten EST+1 identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben.

Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

Fig. 5: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von Euplotes p123 (p123), und Hefe (est2p).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser
Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene
Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind
entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen p123 von Euplotes
aediculatus und est2p von Hefe identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den
entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht
identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch
ein: gekennzeichnet.

Fig. 6: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von Hefe (est2p) und Mensch (phTC).

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe und dem identifizierten EST+1 identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein: gekennzeichnet.

25

30

15

20

Fig. 7: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von Euplotes p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC).

Der in der Fig. 5 dargestellte Vergleich zwischen Euplotes p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC) wurde mit dem Clustal Method Subprogramm der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) unter Standardtbedingungen durchgeführt. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe, p123 von Euplotes aediculatus und dem

identifizierten EST+1 identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Zusätzlich sind die Bereiche, die zwischen allen drei Proteinen identisch sind, durch einen hellgrauen Balken oberhalb der Proteinsequenz gekennzeichnet.

5

- Fig. 8: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 1) (SEQ ID No. 3).
- Fig. 9: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 2) (SEQ ID No. 4).
- Fig. 10: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 3) (SEQ ID No. 5).
 - Fig. 11: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 8 (RACE Runde 3) (SEQ ID No. 6).

15

Fig.12: Übersicht zur Klonierung der vollständigen hTC cDNA. Die Positionen der Startund Stopcodons sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die schwarzen Bereiche der
Rechtecke symbolisieren für Protein kodierende Sequenzabschnitte, während die
hellgrauen Bereiche 5' und 3' untranslatierte cDNA Regionen symbolisieren bzw.
für Intronsequenzen stehen. Die dunkelgrauen Blöcke im Rechteck für die Full
length cDNA stehen entweder für das Telomerase-spezifische Motiv (T), oder für
die sieben Reverse Transkriptase Motive (Nummer 1-7).

20

die sieben Reverse Transkriptase Motive (Nummer 1-7).

Die DNA-Fragmente, die zur Darstellung der vollständigen hTC cDNA notwendig sind, sind ebenfalls als Rechtecke dargestellt und entsprechend ihrer Herkunft gekennzeichnet. Alle Rechtecke sind in ihrer Position relativ zueinander angeordnet. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck AA261296 steht, ist in Beispiel 2 beschreiben. Die relative Position der 182 bp Deletion in diesem Fragment (vergleiche Beispiel 2) ist durch eine Lücke im Rechteck gekennzeichnet. Die Herkunft der DNA-Fragmente, für die die Rechtecke RACE1, RACE2 und RACE3 stehen, sind in Beispiel 6 beschreiben. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck C5F-Fragment steht, ist in Beispiel 7 beschreiben. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck Lambda12 steht, ist in Beispiel 9 beschreiben. Der 3' Teil in dem DNA-Fragment Lambda 12, der für eine nicht mit hTC in Verbindung stehende cDNA codiert (vergleiche Beispiel 9), ist in dieser Ab-

30

25

10

15

20

25

30

bildung nicht dargestellt. Die vollständige hTC-cDNA Sequenz wurde unter Verwendung der in dieser Abbildung dargestellten DNA-Fragmente Lambda 12 und C5F an den 5' und 3' Splicestellen zusammengefügt (vergleiche Beispiel 7) Diese Splicestellen wurden in diversen Fragmenten identifiziert (RACE 1, RACE 3, Lambda 12 und C5F).

Fig. 13: Detailausschnitte aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* und Mensch (hTC).

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus einem Proteinsequenzvergleich zwischen den katalytischen Telomerase-Untereinheiten von Euplotes und Mensch (hTC). In den umrandeten Boxen sind die Motive für die Reverse Transkriptase hervorgehoben. Die Ziffern unter den Umrandungen beziehen sich auf die jeweilige Aminosäureposition in der Fig. 2. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Identische Aminosäuren sind fett gedruckt. In der Konsensussequenz für das Reverse Transkriptase (RT consensus)-Motiv steht h für eine hydrophobe Aminosäure und p bezeichnet eine polare Aminosäure Sind diese Gruppen von Aminosäuren in der Aminosäuresequenz von Euplotes und hTC erhalten, sind p bzw. h fettgedruckt. Sehr hoch konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. In RT3 ist die umrandete Box erweitert, um zusätzliche homologe Aminosäuren zu erfassen. Das Telomerase-spezifische Motiv ist in Beispiel 9 beschrieben.

Fig. 14: Generierte DNA-Sequenz aus Beispiel 11 (3' Variante) (SEQ ID No. 7). Der nicht zu der in Fig. 1 dargestellten DNA-Sequenz homologe Bereich ist fett hervorgehoben.

Fig. 15: hTC Expression in Krebszellinien und in normalem humanen Gewebe. Abb. A: Auf dem Northern-Blot wurden nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech) etwa 2 μg poly A⁺ RNA aus verschiedenen humanen Zellinien immobilisiert. Im einzelnen stammte die RNA aus einem Melanom (G361), einem Lungenkarzinom (A549), aus einem Adenokarzinom des Kolons (SW480), aus einem Burkitt Lymphom Raji, aus einer Leukämie Zellinie (MOLT-4), aus einer chronischen Leukämie Zellinie (K-

10

15

20

25

30

562), aus einem Cervixtumor (HeLa) und aus der Leukämie Zellinie HL60. Die gekennzeichneten 4,4 kb, 6 kb und 9,5 kb Transkripte sind spezifisch für hTC (vergleiche Beispiel 10). Abb. B: Auf dem Northern-Blot wurden nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech) etwa 2 μg poly A⁺ RNA aus verschiedenen humanen Geweben immobilisiert. Im einzelnen wurde die RNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas isoliert. Ein RNA-Größenstandard ist dargestelt.

Fig.16: Western-Blot Analyse der Kaninchenseren gegen Peptide aus der humanen Telomerase-Aminosäuresequenz (Beispiel 12). Jeweils 20 µl der bakteriellen Lysate aus Beispiel 13 wurden unter zuhilfenahme der Antiseren aus Beispiel 12 in einem Western-Blot (Ausubel et al., 1987) analysiert. In den Spuren 1, 2, 6 und 7 wurden Lysate aus Bakterien, die das pMALEST-Konstrukt beinhalten, aufgetragen. In den Spuren 3, 4, 8 und 9 wurden Lysate aus Bakterien, die das pMALA1-Konstrukt beinhalten, aufgetragen. In den Spuren 1, 3, 6 und 8 sind Lysate aus nicht mit IPTG (Isopropyl-beta-thiogalaktopyranosid) induzierten Bakterien aufgetragen. In den Spuren 2, 4, 7 und 9 sind Lysate aus mit IPTG induzierten Bakterien aufgetragen. In der Spur 5 wurde ein Standardgrößenmmarker (10 kDa Protein-Leiter der Firma Life Technologies, Kat. Nr. 10064-012) aufgetragen. Die 50 kDa- und 120 kDa-Banden sind am Rande der Membranen gekennzeichnet. Die PVDF-Membran in der Abb. A mit den Spuren 1 bis 4 wurde mit Preimmunseren gegen das Peptid B (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in Abb. B mit den Spuren 6 bis 9 wurde mit Preimmunseren gegen das Peptid C (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in der Abb. B mit den Spuren 1 bis 4 wurde mit Immunseren gegen das Peptid B (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in Abb. B mit den Spuren 6 bis 9 wurde mit Immunseren gegen das Peptid C (vergleiche Beispiel 12) inkubiert.

Fig.17: Autoradiogramm von ³⁵S-markiertem, *in vitro* translatiertem Protein. In der Spur 1 wurde das vollständige *in vitro* translatierte hTC aufgetragen (vergleiche Beispiel 15). In der Spur 2 wurde eine C-terminal verkürzte Version von phTC aufgetragen. Die Spur 3 zeigt eine vom Hersteller (vergleiche Beispiel 15) gelieferte

Positivkontrolle für die *in vitro* Translation. Zur Abschätzung der Proteingrößen ist auf der rechten Seite ein Proteingrößenstandard gekennzeichnet.

Fig. 18: Autoradiogramm von ³²P-markierten Produkten aus dem TRAP-Assay (vergleiche Beispiel 15). In den Spuren 1 und 2 wurde als Negativkontrolle ein TRAP-Assay Ansatz ohne Zugabe von Enzym oder Protein aufgetragen. In den Spuren 3 und 4 wurde als Positivkontrolle ein TRAP-Assay-Ansatz mit partiell aufgereinigter humaner Telomerase aus HeLa-Zellen aufgetragen. In den Spuren 5 und 6 wurde ein TRAP-Assay-Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC unverdünnt aufgetragen. In den Spuren 7 und 8 wurde ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC in einer 1:4 Verdünnung aufgetragen. In den Spuren 9 und 10 wurde ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC in einer 1:16 Verdünnung aufgetragen. In den Spuren 11 und 12 wurde als Negativkontrolle ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatierter Luziferase aufgetragen.

15

20

10

5

Fig. 19: Autoradiogramm von ³²P-markierten Produkten aus dem direkten Telomerase Assay (vergleiche Beispiel 15). In der Spur 1 wurde ein radioaktiv markierter 10 bp-Marker aufgetragen. In der Spur 2 wurde ein 5' radioaktiv markiertes Telomeroligonukleotid ([TTAGGG]₃) aufgetragen. Bei der Spur 3 handelt es sich um eine leere Spur. In der Spur 4 wurde als Positivkontrolle partiell aufgereinigte humane Telomerase aus HeLa-Zellen im direkten Assay verwendet und das Syntheseprodukt aufgetragen. In der Spur 5 wurde das *in vitro* translatierte phTC aus Beispiel 15 im direkten Assay verwendet und das Syntheseprodukt aufgetragen.

Beispiele

Beispiel 1

5

10

15

Es wird heute angenommen, daß weniger als 5 % des humanen Genoms tatsächlich transkribiert und in Protein translatiert werden. Durch die gezielte Untersuchung dieser kodierenden Genomanteile könnten bereits vor der kompletten Sequenzierung des Genoms wichtige Informationen über die 60 000 - 70 000 Gene in einer humanen Zelle gewonnen werden. Die Automatisierung der Hochdurchsatz-DNA-Sequenziertechnologie in den letzten 10 bis 15 Jahren ermöglichte es, viele cDNAs aus Plasmid-cDNA-Bibliotheken unterschiedlichsten Ursprungs zu sammeln und das jeweilige 5'- bzw. 3'-Ende zu sequenzieren. Diese typischerweise 300 bis 400 bp kurzen DNA-Sequenzen werden "Expressed Sequence Tags" oder kurz ESTs genannt und sind in verschiedenen spezialisierten Datenbanken zusammengefaßt. Der EST-Ansatz wurde zuerst von Okubo et al. (1992) beschrieben und von Adams et al. (1992) auf einen größeren Maßstab übertragen. Gegenwärtig sind etwa 50 000 Gene aus humanen Zellen teilweise sequenziert und als EST-Eintragung dokumentiert.

Durch den Vergleich mit DNA- und Aminosäuresequenzen bekannter Gene können verwandte, aber bislang unbekannte Gene in diesen EST-Datenbanken identifiziert werden (Gerhold and Caskey, 1996). Ein Suchalgorithmus, der sich hierfür besonders bewährt hat, ist das tBLASTn (Altschul et al., 1990). Dieser Algorithmus translatiert jede DNA-Sequenz in der EST-Datenbank in alle sechs möglichen Leserahmen und vergleicht diese Aminosäuresequenzen mit der bekannten Proteinsequenz.

25

30

20

Mit der kürzlich publizierten Proteinsequenz für die katalytische Telomerase-Untereinheit aus Euplotes aediculatus, p123 (Lingner et al., 1997), wurde die EST-Datenbank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchsucht. Als Resultat wurde ein humaner EST mit der Accession Nummer AA281296 identifiziert, der im Leserahmen +1 eine signifikante Homologie zu p123 aufweist. Diese Aminosäuresequenz mit dem Leserahmen +1 wird im folgenden als EST+1 bezeichnet.

10

15

20

Die Homologie zwischen p123 und dem EST+1 ist am auffälligsten in zwei Sequenzbereichen, die durch 30 Aminosäuren getrennt sind. Der längere Sequenzbereich, der sich bei p123 von Aminosäure 438 bis 484 erstreckt, ist zu 38% identisch zu dem korrespondierenden Bereich im EST+1. Werden auch ähnliche Aminosäuren berücksichtigt, liegt die Übereinstimmung sogar bei 59%. Der zweite Homologieblock erstreckt sich im p123-Protein von Aminosäure 513 bis 530 und weist eine 44%ige Identität zu dem entsprechenden Sequenzabschnitt im identifizierten EST+1 auf. Unter Berücksichtigung von Aminosäureresten mit ähnlichen Eigenschaften findet sich eine Überstimmung von 61%.

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung einer BLAST-Suche ist der Wert P (Probability). P gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein spezifisches Segmentpaar auch in einer BLAST-Suche mit einer Zufallssequenz gefunden würde und bewegt sich numerisch zwischen 0 (Resultat hoch signifikant) und 1 (Ergebnis ohne Bedeutung). So verlief z.B. der Vergleich des p123 Äquivalents aus Hefe (est2p) mit der NCBI-EST-Datenbank negativ: Der gefundene EST hatte eine Wahrscheinlichkeit von P=1 (Tab. 1). Dagegen weist das humane Telomerase- assoziierte Protein 1 (hTP1), das in einer der Allgemeinheit nicht zugänglichen EST-Datenbank gefunden wurde (Harrington et al., 1997), eine Wahrscheinlichkeit von P=0.004 auf.

bekanntes Gen (Spezies)	P	identifiziertes Gen	Ursprung der cDNA Bi- bliothek
est2p (Saccharomyces cerevisiae)	0.999	Ratten EST	Niere
p80 (Tetrahymena termophilia)	0.004	hTP1 (Harrington et al., 1997)	Krypten des Darmepithels
p123 (Euplotes ae- diculatus)	3.5×10 ⁻⁰⁶	AA281296	Keimzentren der Tonsillen

Tab. 1: Vergleich dreier tBlastn-Suchläufe mit verschiedenen bekannten Genen.

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte humane EST AA281296 hat eine Wahrscheinlichkeit von P=3.5x10⁻⁰⁶.

Diese Daten legen nahe, daß der identifizierte EST aller Wahrscheinlichkeit nach für ein Fragment der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase kodiert. Daher wird das korrespondierende Gen im folgenden mit hTC (human Telomerase, catalytic) und das abgeleitete Protein mit phTC abgekürzt.

Beispiel 2

5

10

15

20

25

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte EST wurde am 2. April 1997 in die EST-Datenbank eingespeist und ist in keiner Zeitschrift publiziert. Die cDNA-Bibliothek, in welcher dieser EST-Klon vorliegt, wurde laut Angaben des National Center for Biotechnology Information wie folgt hergestellt:

Nach Präparation der mRNA aus den Keimzentren der Tonsillen wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und die doppelsträngigen cDNA-Fragmente gerichtet über die Restriktionsenzymschnittstellen Not I und Eco RI in den Vektor pT7T3D-Pac kloniert.

Die Sequenzierung der in die EST-Datenbank eingespeisten 389 bp erfolgte über den - 28m13 rev2-Primer der Firma Amersham (DNA-Sequenz siehe Fig. 1Position 1685 bis 2073).

Unter Verwendung der Lasergene Programmsoftware (Dnastar Inc.) wurde die DNA-Sequenz von EST AA281296 entsprechend des humanen genetischen Codes translatiert. Die resultierende Aminosäuresequenz (EST₊₁) enstpricht der Position 542 bis 670 in Fig. 2.

Die abgeleitete Proteinsequenz von EST+1 setzt sich aus 129 Aminosäuren zusammen, darunter 27 basische, 11 saure, 51 hydrophobe und 28 polare Aminosäurereste.

Der in Beispiel 1 identifizierte EST (AA 281296) wurde kommerziell von der Research Genetics, Inc. (Huntsville) in Form eines in *E. coli* transformierten Plasmids erworben und experimentiell analysiert:

Wie in dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel der Fig. 3 gezeigt, wird nach Restriktionsverdau der hergestellten Plasmid DNA vom EST AA 281296 ein etwa 2,2 kb großes Fragment aus dem Vektor pT7T3D freigesetzt. Anhand einer parallel durchgeführten Polymeraseketten- (PCR) -Reaktion mit spezifischen internen Primern wurde der EST AA281296 überprüft.: Die Länge der erwarteten PCR Produkte liegt bei 325 und 380 bp und stimmt mit der Länge der experimentell gefundenen Fragmente überein (vergl. Spur 4 und 5 in Fig.3). Damit konnte gezeigt werden, daß der vom Research Genetics, Int. (Huntsville) zugesandte E.coli-Klon den identifizierten EST als Plasmid beinhaltet.

10

15

5

Nach DNA-Präparation wurden die insgesamt 2176 bp des Inserts durch Doppelstrangsequenzierung identifiziert. Ein Sequenzvergleich des Klons AA281296 mit der DNA-Sequenz des C5F-Fragments (vergleiche Beispiel 7) ergab, daß eine 182 bp Deletion vorliegt (Position 2352 bis 2533, Fig. 1) und sich somit der offene Leserahmen in diesem Bereich verschiebt. Zusammenfassend setzt sich die DNA-Sequenz von Klon AA281296 somit aus den Sequenzinformationen der Fig. 1 (Position 1685 bis 2351 und Position 2534 bis 4042) zusammen.

Beispiel 3

20

25

Im tBLASTn Vergleich werden nur die Bereiche mit den höchsten Übereinstimmung zwischen p123 und EST+1 identifiziert (Aminosäuren 438-530, in p123), wogegen die dazwischenliegenden Aminosäuren nicht berücksichtigt werden. Um Aussagen über die Verwandtschaft der Proteinsequenzen über einen größeren Bereich (Aminosäuren 437-554, in p123) zu treffen, wurde ein "Lipman-Pearson Proteinvergleich" durchgeführt (siehe Fig. 4). Hierbei wurden 34% identische Aminosäuren bzw. 59% Aminosäuren, die entweder identisch oder biochemisch ähnlich sind, gefunden. Dieses Ergebnis zeigt, daß sich auch außerhalb der mit dem tBLASTn gefundenen Homologiebereiche die Verwandtschaft zwischen diesen Proteinen fortsetzt.

30

Wie kürzlich berichtet (Lingner et al., 1997), sind p123 aus Euplotes aediculatus und est2p aus Saccharomyces cerevisiae zueinander homolog. Um den Grad der Verwandtschaft

zwischen p123 und est2p ins Verhältnis zu der hier beschriebenen Homologie zwischen p123 und EST+1 zu stellen, wurde die oben beschriebene Region von p123 (Aminosäuren 437-554) mit Hilfe des Lipman-Pearson Proteinvergleichs unter Verwendung identischer Parameter auch mit est2p verglichen. Dabei zeigte sich, daß p123 und est2p in diesem ausgewählten Bereich zu 21% identisch sind bzw. 22% identische Aminosäuren oder biochemisch ähnliche Aminosäurereste aufweisen (siehe Fig. 5). Demnach ist die Homologie zwischen EST+1 und dem p123 von *Euplotes* signifikant höher als zwischen die p123 und est2p.

10 Beispiel 4

5

15

25

30

Die Homologie von p123 zu EST₊₁ und est2p legt die Schlußfolgerung nahe, daß alle 3 Proteine zur gleichen Proteinfamilie gehören. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde est2p unter den in Beispiel 3 erwähnten Bedingungen mit EST₊₁ verglichen (siehe Fig. 6). Dabei zeigte sich, daß EST₊₁ 20% Identität zu est2p hat, also eine vergleichbare Homologie wie p123 zu est2p aufweist. Diese vergleichsweise geringe Übereinstimmung bestätigt auch den Befund, daß in der tBLASTn-Suche mit est2p kein signifikanter EST identifiziert wurde (siehe Beispiel 1).

20 Beispiel 5

Um für die Proteinfamilie der katalytischen Telomerase-Untereinheiten aus verschiedenen Spezies wichtige, unter Umständen funktionelle Domänen, zu identifizieren, wurde ein Computervergleich mit p123, est2p und phTC durchgeführt (siehe Fig. 7). Bei dieser Analyse fallen insbesondere zwei Bereiche auf, die in allen drei Proteinen enthalten sind (siehe Fig. 7). Dem Bereich, der bei p123 den Aminosäuren 447 bis 460 entspricht (Fig. 13, Telomerase Motiv) kann gegenwärtig keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Eine Motiv-Suche mit dem "Wisconsin Sequence Analysis Package" von der "Genetics Computer Group" (GCG) und eine Suche in einer Protein-Datenbank (Swissprot, Ausgabe vom 8.6.1997) ergaben keine signifikanten Erkenntnisse.

10

15

20

25

Dagegen weist ein zweiter, zwischen p123, est2p und phTC homologer Bereich, der bei p123 den Aminosäuren 512-526 entspricht, ein Konsensus-Motiv für eine Reverse Transkriptase (RT) auf (Fig. 7 und 13). Lingner et al. (1997) konnten zeigen, daß p123/est2p insgesamt 6 solcher RT-Motive enthalten, die für die katalytische Funktion von p123/est2p essentiell sind. Wie in Fig. 7 und 13 dargestellt, sind in der untersuchten Sequenz von phTC auch zwei solcher RT-Motive konserviert. Hierbei handelt es sich um die RT-Motive, welche bei p123/est2p am weitesten N-terminal lokalisiert sind (Lingner et al., 1997).

Die Primärsequenzen von Reversen Transkriptasen sind stark divergent; nur wenige Aminosäuren sind innerhalb eines separaten Motivs vollständig konserviert (Poch et al., 1989 und Xiong and Eickbush, 1990). Außerdem unterscheiden sich Reverse Transkriptasen, die von Retroviren oder Long Terminal Repeat (LTR) Retrotransposons kodiert werden, durch verschiedene Abstände zwischen den konservierten RT-Motiven von solchen Reversen Transkriptasen, die von Nicht-LTR Retrotransposons oder der Gruppe II Introns kodiert werden (Xiong and Eickbush, 1990). Entsprechend des Aufbaus ihrer RT-Motive sind p123, est2p und phTC letzterer RT-Gruppe zuzuordnen. Interessanterweise entsprechen dabei die Konsensussequenzen der RT-Motive in phTC am genauesten dem postulierten RT-Konsensus-Motiv: Von acht Aminosäureresten innerhalb der zwei RT-Motive sind bei phTC 6, bei p123 und est2p hingegen nur 5 Aminosäuren zu finden (Fig. 7 und 13). Auffällig sind hierbei insbesondere die hydrophoben Aminosäuren wie Leucin und Isoleucin sowie die Aminosäuren Lysin und Arginin in bestimmten Positionen (Fig. 7 und 13).

Zusammenfassend konnte hiermit auf deskriptiver Ebene gezeigt werden, daß der aufgrund seiner Homologie zu p123 identifizierte Klon AA281296 ein Fragment der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase darstellt.

Beispiel 6

Zur Klonierung des 5'-Endes der hTC-cDNA wurden zusätzlich zu dem in Beispiel 8 aufgeführten Homologiescreening drei aufeinanderfolgende RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Reaktionen durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA

(Fa. Clontech) aus der humanen Leukämiezellinie K562 bzw. aus humanem Testisgewebe eingesetzt. Nachfolgend ist die Durchführung sowie das Ergebnis der einzelnen RACE-Runden beschrieben.

Darüberhinaus wurden die Sequenzinformationen der RACE-Runden genutzt, um per PCR die Einzelfragmente als einen zusammenhängenden cDNA-Klon zu amplifizieren.

RACE-Runde 1:

In einem Endvolumen von 50 µl wurden 5 µl K562 Marathon-Ready cDNA (Fa. Clontech, 10 Katalognummer 7441-1) mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Als Primer wurden 10 pmol des internen genspezifischen Primers GSP2 (5'-GCAACTTGCTCCAGACACTCTTCCGG-3') aus dem 5'-Bereich des hTC-Marathon Adaptor Primers 15 10 pmol des EST-Klons sowie CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; Fa. Clontech) zugefügt. Die PCR wurde in 4 Schritten durchgeführt. Nach einer einminütigen Denaturierung bei 94°C wurde über 5 Zyklen für 30 sec bei 94°C denaturiert und anschließend für 4 min bei 72°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert. Es folgten 5 Zyklen, bei denen für 30 sec die DNA bei 94°C denaturiert wurde, die anschließende Primerverlängerung aber für 4 min bei 20 70°C erfolgte. Abschließend wurden dann 22 Zyklen durchgeführt, bei denen nach den 30 sec DNA-Denaturierung die Primeranlagerung und Kettenverlängerung für 4 min bei 68°C stattfand.

Im Anschluß an diese PCR wurde das PCR-Produkt 1:50 verdünnt. Fünf μl dieser Verdünnung wurden in einer zweiten "nested" PCR zusammen mit 10 pmol dNTP-Mix in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase-Mix sowie 10 pmol des Primers GSP2 und 10 pmol des "nested" Marathon Adaptor Primers AP2 (5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; Fa. Clontech) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen entsprachen den in der ersten PCR gewählten Parametern. Als einzige Ausnahme wurden im letzten PCR-Schritt statt 22 Zyklen nur 16 Zyklen gewählt.

Als Produkt dieser Nested-RACE-PCR wurde ein 1153 bp langes DNA-Fragment erhalten. Dieses wurde in den TA-Cloning Vektor pCR2.1 der Fa. InVitrogen kloniert und vollständig doppelsträngig sequenziert (Fig. 8 und SEQ ID No. 3).

Die Nukleotide 974 bis 1153 repräsentieren die in Fig. 1 dargestellte Nukleotidregion 1629 bis 1808 der hTC-cDNA. Bei dem von bp 1-973 reichenden Nukleotidbereich, der keine Homologie zu der in Fig. 1 gezeigten hTC-cDNA-Sequenz aufweist, handelt es sich um Intronsequenzen des hTC-Gens (Daten nicht gezeigt). Eine 3'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden. Die Präsenz von Intronsequenzen könnte auf unvollständig gesplicte mRNA als Ausgangssubstanz für die cDNA-Synthese zurückzuführen sein. Auch genomische DNA-Kontaminationen in der cDNA könnten das Auffinden von Intronsequenzen erklären.

RACE-Runde 2:

15

20

25

30

10

5

Basierend auf den Sequenzdaten der ersten RACE-Runde wurde eine zweite RACE mit dem genspezifischen Primer GSP5 aus der 5'-Region von RACE-Produkt 1 (5'-GGCAGTGACCAGGAGGCAACGAGAGG-3') sowie dem AP1-Primer durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech; Katalognummer 7414-1) verwendet. Es wurden gleiche PCR-Bedingungen wie bei der 1. PCR in RACE-Runde 1 gewählt. Auch in RACE-Runde 2 wurde an die 1. PCR eine 2. "nested" PCR mit verdünntem PCR-Produkt als cDNA-Quelle angeschlossen. Als "nested" PCR-Primer wurden der genspezifische Primer GSP6 aus der 5'-Region von RACE-Produkt 1 (5'-GGCACACTCGGCAGGAAACGCACATGG-3') sowie der AP2-Primer genutzt. Die Bedingungen entsprachen den Parametern der Nested-PCR aus RACE-Runde 1.

Das 412 bp lange PCR-Produkt der Nested-PCR aus RACE-Runde 2 wurde in den TA-Cloning Vektor pCRII-Topo der Fa. Invitrogen kloniert und vollständig sequenziert (Fig. 9 und SEQ ID No. 4). Der Sequenzabschnitt von bp 267 bis bp 412 ist komplett homolog zu dem 5'-Bereich des Produktes aus RACE 1. Die Region von bp 1 bis bp 266 verlängert

RACE-Produkt 1 am 5'-Ende. Bei diesem RACE-Produkt 2 handelt es sich wahrscheinlich komplett um einen Intronbereich des hTC-Gens (Daten nicht gezeigt).

RACE-Runde 3:

5

10

15

20

Eine dritte RACE-Runde führte zur Identifizierung von weiter 5'-gelegenen hTC-cDNA-Regionen. Ausgehend von den Sequenzergebnissen der RACE-Runde 2 wurde ein genspezifischer Primer GSP9 (5'-CCTCCTCTGTTCACTGCTCTGGCC-3') aus dem 5'-Bereich des RACE-Produkts 2 gewählt und zusammen mit dem AP1-Primer und Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech) in einer neuen RACE eingesetzt. Die RACE-Bedingungen glichen denen der 1. PCR in RACE 1 und 2. In der nachfolgenden "nested" RACE, die, entsprechend der "nested"-RACE in Runde 1 und 2, mit dem genspezifischen Primer GSP 10 aus dem 5'-Bereich von RACE-Produkt 2 (5'-CGTAAGTTTATGCAAACTGGACAGG-3') und AP2 erfolgte, wurde ein 1012 bp langes Fragment (Fig. 10 und SEQ ID No. 5) amplifiziert und in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO kloniert. Die nachfolgende Sequenzierung zeigte, daß die 3'-Region dieses RACE-Fragments (bp 817 - bp 1012) offensichtlich noch Intronsequenz des hTC-Gens darstellt. Komplett homolog zur 5'-Region von RACE-Produkt 2 ist der Bereich von bp 889-1012. Dagegen ist der 5'-Bereich dieses Fragments von bp 1-bp 816 identisch mit der in Fig. 1 gezeigten Region von bp 814 - bp 1629 der hTC-cDNA. Eine potentielle 5'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden.

Beispiel 7

Zur Klonierung eines zusammenhängenden Fragments aus den Sequenzinformationen von RACE 2 und dem Klon AA281296 wurde eine PCR durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech; Katalognummer 7414-1) verwendet. Der PCR Ansatz erfolgte wie unter RACE 1 (vergleiche Beispiel 6) beschrieben, allerdings mit den Primern C5F (5'-CGAGTGGACACGGTGATCTCTGCC-3') aus der 5' Region von RACE 2 und dem Primer C3B (5'- GCACACCTTTGGTCACTCCAAATTCC-3') aus der 3' Region vom Klon AA281296. Die PCR wurde in 2 Schritten durchgeführt. Nach einer einminütigen Denaturierung bei 94°C wurde über 36 Zyklen für 30 sec bei 94°C

denaturiert und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert.

Als Produkt dieser PCR wurde ein 2486 bp langes DNA-Fragment, im folgenden als C5F-Fragment bezeichnet, erhalten. Dieses wurde in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. Invitrogen kloniert und vollständig doppelsträngig sequenziert. Ein Sequenzvergleich von dem C5F-Fragment mit DNA-Sequenz vom Klon AA281296 ergab, daß zwischen dem RT-Motiv 3 und RT-Motiv 4 eine 182 bp lange in frame Insertion vorliegt (Position 2352 bis 2533, Fig.1). Ein weiterer Vergleich der DNA vom C5F-Fragment mit den Sequenzen der drei RACE-Runden machte deutlich, daß am 3' Ende von C5F ein bereits in RACE 2 identifiziertes Intron vorliegt. Eine 3'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden. Zusammenfassend setzt sich die DNA-Sequenz vom C5F-Fragment somit aus den Sequenzinformationen der Fig. 9 (Position 64 bis 278) und den Sequenzdaten der Fig. 1 (Position 1636 bis 3908) zusammen.

15

20

25

30

10

5

Beispiel 8

Zur Klonierung des 5'-Endes der hTC-cDNA wurden zusätzlich zu dem in Beispiel 6 aufgeführten RACE-Protokoll ein Homologiescreening (Ausubel *et al.*, 1987) durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde eine humane Erythroleukemia 5'-Stretch Plus cDNA Bibliothek (Fa. Clontech, Kat. Nr. HL5016b) aus der humanen Leukämiezellinie K562 verwendet. Etwa $3x10^6$ Pfu dieser random und oligo dT geprimten Bibliothek wurden wie bei Ausubel *et al.*, (1987) ausplattiert und zum Screening eingesetzt. Als Probe wurde ein 719 bp langes (Position 1685 bis 2404, entsprechend der Fig. 1) radioaktiv markiertes hTC-DNA-Fragment benutzt.

Von 20 putativ positiven λ Klonen konnte nach einem Rescreening mit der gleichen hTC-Sonde der λ Klon 12 als positiv verifiziert werden. Nach Plaqueaufreinigung und λ DNA-Präparation (Ausubel *et al.*, 1987) wurde das 4kb Insert in den Vektor pBluescript

umkloniert und durchsequenziert (Fig. 11 und SEQ ID No. 6).

Ein Vergleich der λ Klon 12-Sequenz mit den Sequenzen der RACE-Klone und der DNA-Sequenz vom Klon AA281296 ergab, daß dieser im Homologie Screening identifizierte Klon für einen 5′ Teil der hTC-cDNA kodiert und ein putatives ATG-Startcodon in Position 63 entsprechend der Fig.1 aufweist. 5′ von diesem ATG liegt kein Stopcodon im gleichen Leserahmen vor. Weitere Sequenzanalysen machen deutlich, daß der λ Klon 12 von Position 1656 bis 2004 wahrscheinlich ein Intron enthält. Sehr gut konservierte 5′ und 3′ Splicestellen belegen diese Hypothese. Die für die hTC-cDNA kodierende Sequenz setzt sich dann von Position 2005 bis Position 2382 fort. Die Sequenz von 2383 bis zum 3′ Ende vom λ Klon 12 weist einen auffälligen offenen Leserahmen in Leseraster -4 auf. Eine bioinformatorische Analyse der entsprechenden DNA-Sequenz zeigte, daß dieser Leserahmen über etwa 400 bp identisch zu diversen ESTs ist, die in keinem Zusammenhang zur hTC-cDNA stehen. Somit handelt es sich bei dem λ Klon 12 um einen chimären Klon, der sich im wesentlichen aus dem 5′ Ende der hTC cDNA und einem weiteren cDNA-Klon unbekannter Funktion zusammensetzt.

15

20

25

30

10

5

Eine zusammenfassende schematische Darstellung mit der relativen Orientierung der RACE-Produkte und des Homologiescreenings ist in Fig. 12 dargestellt. Die vollständige Sequenz der hTC-cDNA (Fig. 1) wurde aus dem λ Klon 12 (Position 21 bis 1655 entsprechend der Fig. 11), dem PCR-Produkt C5F (Position 1636 bis 3908 entsprechend der Fig. 1) und dem EST AA281296 (Position 3909 bis 4042 entsprechend der Fig. 1) zusammengesetzt.

Beispiel 9

Durch einen Vergleich der phTC-Proteinsequenz (Fig. 2 und SEQ ID No. 2) mit einer Konsensussequenz von Reversen Transkriptasen (Poch et al.., 1989, Xiong and Eickbush, 1990) wurden insgesamt sieben Motive für Reverse Transkriptasen (RT-Motive) identifiziert (Fig. 13). Innerhalb dieser Motive sind einige Aminosäuren nicht nur zwischen der RT-Konsensussequenz und dem phTC, sondern auch im Vergleich zu dem Telomeraseprotein aus Euplotes hoch konserviert. So sind z.B. in RT-Motiv 5 zwei Asparaginsäuren (Position 868 und 869 in Fig. 2) völlig konserviert (Fig. 13). Das aus anderen Reverse

Transkriptasen abgeleitete RT-Motiv 7 (Poch et al.., 1989, Xiong and Eickbush, 1990) wurde nur in der humanen katalytischen Telomeraseuntereinheit aufgezeigt, nicht in dem Euplotes-Protein (Fig. 13).

Auffällig sind weiterhin Strukturmerkmale, die sich nur in den Telomeraseproteinen, nicht jedoch in anderen Reverse Transkriptasen aufzeigen lassen. Das Telomerase Motiv (Position 553 und 565 in Fig. 2) ist eine für diese Proteinfamilie spezifische Struktur, da es in keinem bisher bekannten Protein vorkommt. Ein weiteres nur in den katalytischen Telomeraseproteinen identifiziertes Merkmal ist der Abstand zwischen den RT-Motiven 3 und 4, der mit 107 Aminosäuren deutlich größer ist als in anderen RTs. Diese Besonderheiten erlauben die Schlußfolgerung, daß die katalytischen Untereinheiten der Telomerasen aus verschiedenen Spezies wahrscheinlich eine eigene Untergruppe der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen darstellt.

15 Beispiel 10

5

10

20

Die Expression der Telomerase RNA-Untereinheit (hTR) korreliert nicht mit der Telomeraseaktivität, sondern wird ubiquitär beobachtet (Feng et al., 1995). Somit stellt sich die Frage, ob die Ausprägung dier katalytischen Telomerase-Untereinheit mit der Telomeaseaktivität einhergeht.

Um das hTC-Expressionslevel zu analysieren, wurden Northern Blot-Experimente (Ausubel et al., 1987) durchgeführt. Die kommerziell erhältlichen Northern Blots waren entweder mit einer Reihe von RNA-Präparationen aus normalem, humanem Gewebe (Fa. Clontech; Katalognummer 7760-1) oder mit RNA-Proben aus humanen Krebszellinien (Fa. Clontech; Katalognummer 7757-1) bestückt. Als Probe wurde ein 719 bp langes (Position 1685 bis 2404, entsprechend der Fig.1) radioaktiv markiertes hTC-DNA-Fragment benutzt. Die Inkubation der Membranen mit der Probe erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech).

30

25

In den acht getesteten humanen Zellinien (3 Leukämiezellinien, 3 Carcinomzellinien, ein Melanom und ein Lymphom) wurden zwei RNA-Haupttranskripte in der Größe von etwa

9,5 kb und 4,4 kb und ein RNA-Nebentranskript von etwa 6 kb nachgewiesen, die mit der Probe kreuzhybridisieren (Fig. 15, Abb. A). Die hTC mRNA wurde im Vergleich am stärksten in den Leukämie Zellinien K-562 und HL-60 exprimiert (Fig. 15, Abb. A). Im Gegensatz dazu war das hTC-Transkript in den getesteten normalen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) nicht nachzuweisen (Fig. 15, Abb. B). Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da in diesen Geweben auch keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte (Kim et al., 1994).

Diese Daten deuten darauf hin, daß die Induktion der hTC Expression für die Aktivierung der Telomerase während der Tumorentstehung eine wesentliche Rolle spielt.

Beispiel 11

5

10

15

20

25

Bei der PCR-Amplifikation der hTC-cDNA-Fragmente aus verschiedenen cDNA-Banken (Marathon Ready cDNA der Fa. Clontech aus der humanen Leukämiezellinie K562 und aus humanem Testis sowie cDNA aus der humanen prämyeloischen Leukämiezellinie HL60) wurden stets mehrere PCR-Produkte erhalten, die in ihrer Größe minimal voneinander abwichen. Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen hTC-PCR-Produkten aufzuklären, wurde mit den Primern C5A (5'-CCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGC-3') und C3B (5'-GCACACCTTTGGTCACTCCAAATTCC-) ein von bp 1783 bis bp 3901 reichendes Fragment der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA amplifiziert. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus K562-Leukämiezellen (Fa. Clontech; Katalognummer 7441-1) verwendet (PCR1 und 2). In einer dritten PCR wurde mit den Primern GSP1vor HTRT3A (5'-(5'-GGCTGATGAGTGTGTACGTCGAG-3') und GGGTGGCCATCAGTCCAGGATGG-3') ein hTC-Fragment von bp 1695 bis bp 3463 der hTC-cDNA in Fig. 1 aus HL60-cDNA amplifiziert.

Nachfolgend sind die Bedingungen der 3 PCR-Reaktionen beschrieben:

In der ersten PCR wurden in einem Endvolumen von 50 μl 5 μl K562 Marathon-Ready cDNA mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Je

10

15

20

25

30

10 pmol der Primer C5A und C5B wurden zugefügt. Die PCR wurde in 3 Schritten durchgeführt. An eine einminütige Denaturierung bei 94°C schlossen sich 35 PCR-Zyklen an, in denen die DNA zunächst für 30 sec bei 94°C denaturiert wurde und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert wurde. Zum Abschluß folgte für 10 min eine Kettenverlängerung bei 68°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. InVitrogen kloniert.

In einer zweiten PCR wurden 5 µl K562 Marathon-Ready cDNA mit je 10 pmol der Primer C5A und C3B, 10 pmol dNTP-Mix und 2 U Taq-DNA-Polymerase (Fa. Gibco-BRL) versetzt und in einem Endvolumen von 50 µl eine PCR-Reaktion in 1x PCR-Puffer der Fa. Perkin Elmer durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in 3 Schritten. Zunächst wurde die DNA für 3 min bei 94°C denaturiert. Es folgten 34 Zyklen, bei denen aufeinanderfolgend die DNA für 45 sec bei 94°C denaturiert wurde, anschließend für 1 min bei 68°C die Primeranlagerung erfolgte und danach für 3 min bei 72°C die DNA-Kette verlängert wurde. Im letzten PCR-Schritt wurde für 10 min bei 72°C eine abschließende Kettenverlängerung durchgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCR2.1 der Fa. InVitrogen kloniert.

Für die dritte PCR wurde zunächst mit dem cDNA-Synthese-Kit der Fa. Boehringer Mannheim aus 2 μg DNaseI-behandelter Poly A-RNA der humanen prämyeloischen Zellinie HL60 eine cDNA-Synthese entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt. In einem Endvolumen von 50 μl wurde anschließend 1 μl dieser HL60-cDNA mit je 10 pmol der Primer GSP1vor und HTRT3A sowie 10 pmol dNTP-Mix gemischt und nach Zusatz von 1,25 μl DMSO in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die PCR-Reaktion verlief in 3 Schritten. Nach einer Denaturierung für 3 min bei 94°C wurde über 37 Zyklen die DNA zunächst für 1 min bei 94°C denaturiert und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert. Abschließend erfolgte noch eine Inkubation für 10 min bei 68°C. Die PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert.

Die vollständige Doppelstrangsequenzierung der aus PCR 1 und 2 klonierten hTC-cDNA-Fragmente sowie die partielle Sequenzierung der aus PCR 3 erhaltenen hTC-cDNA-Fragmente zeigte, daß zusätzlich zu der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA 4 Varianten dieser cDNA in humanen Zellen existieren:

5

<u>Variante 1</u> der humanen hTC-cDNA zeichnet sich durch eine 182 bp lange Deletion der Nukleotide 2345 bis 2526 aus. Durch diese Deletion kommt es zu einer Verschiebung im ORF und es wird ein verkürztes hTC-Protein abgelesen, dem die RT-Motive 4 bis 7 fehlen.

10

<u>Variante 2</u> der humanen hTC-cDNA weist eine 36 bp lange Deletion der Nukleotide 2184 bis 2219 auf. Durch diese Deletion geht das RT-Motiv 3 verloren. Der Leserahmen bleibt jedoch erhalten und es wird ein Protein hergestellt, dem selektiv das RT-Motiv 3 fehlt.

15

<u>Variante 3</u> der humanen hTC-cDNA stellt eine Kombination der Varianten 1 und 2 dar. Sie weist sowohl eine Deletion der bp 2184 bis 2219 als auch der bp 2345 bis 2526 auf.

20

Variante 4 der humanen hTC-cDNA zeichnet sich durch den Verlust des Nukleotidbereichs von bp 3219 bis 3842 aus. Diese fehlende Sequenz ist durch eine nicht zu hTC homologe Sequenz ersetzt. Ab bp 3843 ist die Sequenz wieder völlig identisch zu der in Fig. 1 dargestellten hTC-Sequenz. Die Sequenz der Variante 4 ist in Fig. 14 dargestellt. Entsprechend des gewählten 5'-Primers beginnt sie mit bp 1783 der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA. Der nicht-homologe Bereich ist fett hervorgehoben und stimmt von Position 3219 bis Position 3451 (Fig. 14 und SEQ ID No. 7) auf DNA Ebene zu 98,7% mit einem EST (Accession Nr. AA299878) aus einem humanen Uterustumor überein.

25

30

Beispiel 12

Zur Gewinnung von Antiseren mit Spezifität für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase wurde die vorhandene Nukleotidsequenz (Fig. 1) in eine Aminosäuresequenz übersetzt (Fig. 2). Mit Hilfe eines Programms zur Sekundärstrukturvorhersage (PROTEAN, aus dem Softwarepaket DNAStar, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) wurden zwei Peptide ausgewählt, die mit gewisser Wahrscheinlichkeit eine Immunantwort hervorrufen.

Es handelt sich um folgende Peptide, die im Einbuchstabencode für Aminosäuren dargestellt sind:

B: . C-K-R-V-Q-L-R-E-L-S-E-A-E-V-R-Q - CONH₂ / Pos. 594 - 608

C: C-O-E-T-S-P-L-R-D-A-V-V-I-E-Q-S-S-S-L-N-E - CONH₂ / Pos. 781-800

Die unterstrichenen Cysteine stammen nicht aus der Telomerasesequenz, sondern wurden als Linker für die Kopplung zusätzlich angefügt

Die Peptide wurden über das Thiol-reaktive Kopplungsreagenz m-Maleimido-benzoyl-NHydroxysuccinimidester (MBS) an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt. Damit
wurden je zwei Kaninchen im Abstand von 2 bis 4 Wochen immunisiert. Vor der
Immunisierung wurden 5 ml Blut zur Gewinnung von Preimmunseren entnommen. Nach 4
Immunisierungen wurden ebenfalls 5 ml Blut zur Gewinnung von Immunseren entnommen.

Diese Seren wurden in einem Western-Blot Experiment (Ausubel et al., 1987) auf
Reaktivität mit Fusionsproteinen (Beispiel 13) getestet.

Beispiel 13

5

Um das Protein der katalytischen Telomerase-Untereinheit analysieren zu können, wurden bakterielle Expressionversuche durchgeführt.

Die Konstrukte für diese Experimente sind im Folgenden beschrieben:

Für das Expressionskonstrukt pMalEST wurde das Insert des in Beispiel 2 erwähnten Klons AA281296 mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Not I herausgeschnitten, die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (Ausubel et al., 1987) und in den vorgegebenen Leserahmen des Maltose bindenden Proteins des bakteriellen Expressionvektors pMAL-C2 (Fa. New England Biolabs) kloniert. Der Vektor pMAL-C2 wurde mit dem Restriktionsenzym Pst I verdaut und die überstehenden Einzelstrangenden mit der T4 DNA Polymerase entfernt (Ausubel et al., 1987).

10

15

25

30

Das Expressionskonstrukt pMalA1 beinhaltet die Nukleotidsequenz der Fig. 1 von Position 1789 bis Position 3908. Dieses DNA-Fragment wurde über PCR mit den Primern C5A (5'-ACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTG-3') und C3B (5'-GCACACCTTTGGTCACTCCAAATTCC-3') aus einer kommerziell erhältlichen K562 Marathon-Ready cDNA Library (Fa. Clontech, Katalognummer 7441-1) amplifiziert und in TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. Invitrogen kloniert. Die PCR-Bedingungen wurden wie im Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Für das Expressionskonstrukt pMalA1 wurde das Insert mit dem Restriktionsenzym Eco RI herausgeschnitten, die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (Ausubel *et al.*, 1987) und in den mit dem Restriktionsenzym Xmn I geschnittenen bakteriellen Expressionvektors pMAL-C2 (Fa. New England Biolabs) kloniert.

Die Proteinexpression unter Verwendung dieser Konstrukte erfolgte in dem Bakterienstamm E. coli DH5 α . Die Expressionsbedingungen erfolgten wie in der Betriebsanleitung der Fa. New England Biolabs (Katalognummer 800) beschrieben. Die hergestellten bakteriellen Lysate wurden in einem Western-Blot Experiment (Ausubel et al., 1987) getestet.

Beispiel 14

Die bakteriellen Lysate aus Beispiel 13 wurden unter zuhilfenahme der Antiseren aus Beispiel 12 in einem Western Blot (Ausubel et al., 1987) analysiert.

Da der Fusionsanteil für das Maltose bindende Protein etwa 43 kDa groß ist, werden für die Konstrukte pMalEST und pMalA1 Fusionsproteine in der Größe von etwa 74 kDa bzw 106 kDa erwartet.

Im Vergleich der Pre-Immunseren mit den Seren nach der ersten Immunisierung wird ersichtlich, daß spezifische Antikörper gegen die Epitope B und C gebildet wurden (Fig. 16). Darüber hinaus wurden neben den erwarteten 74 kDa, bzw. 106 kDa-Proteinen auch kleinere Proteinfragmente beobachtet, die mit den Antiseren reagieren. Diese kleineren Produkte gehen wahrscheinlich auf vorzeitige zurück.

Auf dem Fusionsprotein aus der Expression mit pMal EST befindet sich nur das Epitop für Serum B. Im Gegensatz dazu befinden sich auf dem Fusionsprotein von pMalA1 die Epitope der Seren B und C. Aus diesem Grunde erkennt das Antiserum C nicht das Expressionsprodukt von pMalEST und lediglich die größeren Proteinfragmente aus den Expressionversuchen mit pMalA1. Diese Beobachtung unterstreicht die hohe Spezifität der generierten Antiseren.

Beispiel 15

5

10 Um das Protein der katalytischen Telomerase-Untereinheit analysieren zu können, sollen die Proteinkomponente zusammen mit der RNA-Komponente in vitro rekonstituiert werden.

Die Konstrukte für diese Experimente sind im folgenden beschrieben:

Die 504 nt lange RNA Komponente (Feng et al., 1995) wurde mit den Primern HTR9BAM 15 (5'-CGCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTGCGGAGGGTGGGCCTG-3') und HTR2BAM (5'-CGCGGATCCCGGCGAGGGGTGACGGATGC-3) aus einer 293 Zell-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Der Primer HTR9BAM beinhaltet von Nukleotid 10 bis 29 einen T7 Promotor. In der PCR wurden in einem Endvolumen von 100 µl 3 µl cDNA 20 aus 293-Zellen mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x PCR-Reaktionspuffer mit 0,5 µl Taq-Polymerase (Fa. Gibco) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Je 10 pmol der Primer HTR9BAM und HTR2BAM wurden zugefügt. Die PCR wurde in 3 Schritten durchgeführt. An eine zehnminütige Denaturierung bei 94°C schlossen sich 35 PCR-Zyklen an, in denen die DNA zunächst für eine Minute bei 94°C denaturiert wurde und anschließend für 2 min 25 bei 62°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert wurde. Zum Abschluß folgte für 4 min eine Kettenverlängerung bei 72°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach einem Restriktionsverdau mit Bam HI in die Bam HI-Schnittstelle des Vektor pUC19 kloniert, so daß die RNA Komponente unter Kontrolle des T7-Promotors steht. Dieses Konstrukt wird im folgenden als HTR504 bezeichnet.

30

Das 3411 bp lange cDNA Fragment (Position 60 bis Position 3470, Fig. 1) wurde in den Vektor PCRII TOPO (Fa. Invitrogen) kloniert. Detailliertere Angaben zur Klonierung sind

15

20

25

30

in Beispiel 8 und 7, bzw. in Fig. 12 beschrieben. In diesem als HTC FL bezeichneten Konstrukt liegt der T7 Promotor 5' vor der hTC cDNA.

Die Synthese der katalytischen Telomerase-Proteinkomponente erfolgte nach Zugabe des hTC FL-Konstruktes in einem kommerziell erhältlichen Transkriptions/Translation-System nach Angaben des Herstellers (Fa. Promega; Katalognummer L4610). Die erfolgreiche *in vitro* Translation des erwarteten 127 kDa Produktes wurde mittels ³⁵S-markiertem Cystein in einer SDS-PAGE (Ausubel *et al.*, 1987) kontrolliert (Fig. 17).

Die Synthese der Telomerase-RNA-Komponente erfolgte mit einem Transkriptions-System nach Angaben des Herstellers (Fa. Ambion; Katalognummer 1344) oder nach der von Pokrovskaya und Gurevich (1994) beschriebenen Methode.

Für die *in vitro* Rekonstitution wurden 50 μl des oben beschriebenen Translations-Ansatzes mit dem hTC FL-Konstrukt mit 0,5 μg hTRNA versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. 2 μl dieser Mischung wurden auf ihre enzymatische Aktivität mit Hilfe des TRAP-Assays untersucht (N.W. Kim *et al.*, 1994). Als Positivkontrolle diente eine Aktivitätsmessung nach gleicher Methode von aus HeLa-Zellen gereinigter Telomerase (Shay *et al.*, 1994). Wie in Fig. 18 zu sehen, erzeugen sowohl das rekonstituierte Enzym als auch das native Enzym das gleiche Produktmuster, die für die Telomerase charakteristische Nukleotidleiter. Mit diesem Ergebnis wurde darüberhinaus belegt, daß eine einzige Proteinkomponente zusammen mit der RNA für die enzymatische Telomeraseaktivität ausreichend ist.

Zusätzlich zu dem beschriebenen TRAP-Assay wurden 5 µl der Rekonstitutionsmischung im direkten Telomerase-Assay (Shay et al., 1994) auf ihre Aktivität geprüft. Auch in diesem Experiment belegt die charakteristische Nukleotidleiter die erfolgreiche Rekonstitution von rekombinantem hTC Protein und Telomerase-RNA-Komponente.

Zusammenfassend konnte hiermit auf funktioneller Ebene gezeigt werden, daß die identifizierte und vollständig klonierte hTC cDNA die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase darstellt.

10

25

35

Literaturvereichnis

Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C. und Venter, J.C. (1992). Sequence identification of 2.375 human brain genes. Nature 355: 632-634.

Allsopp, R. C., Vazire, H., Pattersson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. und Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 10114-10118.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. et al. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1987).

Current protocols in molecular bilogy. Greene Publishing Associates and Whiley-Intersciences, New York.

Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. und Hanahan, D. (1996). Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multistage tumorigenesis. Nature Genetics 12, 200-204.

Broccoli, D., Young, J. W. und deLange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 9082-9086.

Collins, K., Kobayashi, R. und Greider, C. W. (1995). Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. Cell 81, 677-686.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G. Greider, C.W. Harley, C. B. und Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J. 11, 1921-1929.

Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B. und Baccetti, S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. Blood 85, 2315-2320.

Feng, J., Funk, W. D., Wang, S.-S., Weinrich, S. L., Avilion, A.A., Chiu, C.-P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider, C.W. und Villeponteau, B. (1995). The RNA component of human telomerase. Science 269, 1236-1241.

Gerhold, D. und Caskey, T. (1996). It's the genes! EST access to human genome content. BioEssays 18, 973-981.

15

25

30

35

Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. Science 249, 1129-1133.

Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. Cell 43, 405-413.

Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. Cell 51, 887-898.

Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. Nature 337, 331-337.

Harley, C. B., Futcher, A. B. und Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345, 458-460.

Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Amgen EST Program, Bass, M.B., Arruda, I. und Robinson, M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. Science 275: 973-977.

Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D.K. und Allshire, R.C. (1990).
Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. Nature 346, 866-868.

Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., Ishioka, S. und Yamakido, M. (1995). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. J. Immunol. 155, 3711-3715.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C. B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. und Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266, 2011-2015.

Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. und Cech T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. Science 276: 561-567.

Lundblad, V. und Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. Cell 57, 633-643.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in Zea mays. Genetics 26, 234-282.

35

- Meyne, J., Ratliff, R. L. und Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 7049-7053.
- Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., Fukushima, A., Kojima, Y. and Matsubra, K. (1992).

 Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. Nature Genetics 2: 173-179.
 - Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. J. Theor. Biol. 41, 181-190.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. und Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. EMBO J. 8: 3867-3874.
 - Pokrovskaya, I.D. and Gurevich, V.V. (1994). *In vitro* transcription: Preparative RNA yields in analytical scale reactions. Analytical Biochemistry 220, 420-423.
 - Prowse, K. R., Avilion, A. A. und Greider, C. W. (1993). Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 1493-1497.
- Sandell, L. L. und Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss.

 Cell 75, 729-739.
 - Shampay, J. und Blackburn, E. H. (1988). Generation of telomere-length heterogenity in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 534-538.
- Shay, J. W., Brasiskyte, D., Ouellette, M., Piatyszek, M.A., Werbin, H., Ying, Y. and Wright, E.W. (1994). Analysis of telomerase and telomeras. Methods of Molecular Genetics 5, 263-280.
 - Shay, J. W. (1997). Telomerae and Cancer. Ciba Foundation Meeting: Telomeres and Telomerase. London.
- 30 Singer, M. S. und Gottschling, D. E. (1994). *TLC1*: Template RNA Component of Saccharomyces cerevisiae Telomerase. Science 266, 404-409.
 - Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C.B. und Landsdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 9857-9860.
 - Xiong, Y. und Eickbush, T.H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. EMBO J. 9: 3353-3362.

Yu, G.-L., Bradley, J. D., Attardi, L. D. und Blackburn, E. H. (1990). In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. Nature 344, 126-132.

Zakian, V. A. (1995). Telomeres: Beginning to understand the end. Science 270, 1601-1607.

SEQUENZPROTOKOLL

(1)	ALLGEMEINE	ANGABEN:
-----	------------	----------

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: Bayer AG
 - (B) STRASSE: Bayerwerk
 - (C) ORT: Leverkusen
 - (E) LAND: Deutschland
 - (F) POSTLEITZAHL: D-51368
 - (G) TELEFON: 0214-303688
 - (H) TELEFAX: 0214-303482
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humane katalytische Telomerase-Untereinheit

und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTROGER: Floppy disk

 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LONGE: 4042 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKŠLS: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (vi) URSPRŠNLICHE HERKUNFT:
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTTTCAGGCA	GCGCTGCGTC	CTGCTGCGCA	CGTGGGAAGC	CCTGGCCCCG	GCCACCCCCG	60
CGATGCCGCG	CGCTCCCCGC	TGCCGAGCCG	TGCGCTCCCT	GCTGCGCAGC	CACTACCGCG	120
AGGTGCTGCC	GCTGGCCACG	TTCGTGCGGC	GCCTGGGGCC	CCAGGGCTGG	CGGCTGGTGC	180
AGCGCGGGGA	CCCGGCGGCT	TTCCGCGCGC	TGGTGGCCCA	GTGCCTGGTG	TGCGTGCCCT	240
GGGACGCACG	ecceccccc	GCCGCCCCCT	CCTTCCGCCA	GGTGTCCTGC	CTGAAGGAGC	300
TGGTGGCCCG	AGTGCTGCAG	AGGCTGTGCG	AGCGCGGCGC	GAAGAACGTG	CTGGCCTTCG	360
GCTTCGCGCT	GCTGGACGGG	GCCCGCGGG	GCCCCCCGA	GGCCTTCACC	ACCAGCGTGC	420

GCAGCTACCT	GCCCAACACG	GTGACCGACG	CACTGCGGGG	GAGCGGGGCG	TGGGGGCTGC	480
TGCTGCGCCG	CGTGGGCGAC	GACGTGCTGG	TTCACCTGCT	GGCACGCTGC	GCGCTCTTTG	540
TGCTGGTGGC	TCCCAGCTGC	GCCTACCAGG	TGTGCGGGCC	GCCGCTGTAC	CAGCTCGGCG	600
CTGCCACTCA	GGCCCGGCCC	CCGCCACACG	CTAGTGGACC	CCGAAGGCGT	CTGGGATGCG	660
AACGGGCCTG	GAACCATAGC	GTCAGGGAGG	CCGGGGTCCC	CCTGGGCCTG	CCAGCCCCGG	720
GTGCGAGGAG	GCGCGGGGC	AGTGCCAGCC	GAAGTCTGCC	GTTGCCCAAG	AGGCCCAGGC	780
GTGGCGCTGC	CCCTGAGCCG	GAGCGGACGC	CCGTTGGGCA	GGGGTCCTGG	GCCCACCCGG	840
GCAGGACGCG	TGGACCGAGT	GACCGTGGTT	TCTGTGTGGT	GTCACCTGCC	AGACCCGCCG	900
AAGAAGCCAC	CTCTTTGGAG	GGTGCGCTCT	CTGGCACGCG	CCACTCCCAC	CCATCCGTGG	960
GCCGCCAGCA	CCACGCGGGC	CCCCCATCCA	CATCGCGGCC	ACCACGTCCC	TGGGACACGC	1020
CTTGTCCCCC	GGTGTACGCC	GAGACCAAGC	ACTTCCTCTA	CTCCTCAGGC	GACAAGGAGC	1080
AGCTGCGGCC	CTCCTTCCTA	CTCAGCTCTC	TGAGGCCCAG	CCTGACTGGC	GCTCGGAGGC	1140
TCGTGGAGAC	CATCTTTCTG	GGTTCCAGGC	CCTGGATGCC	AGGGACTCCC	CGCAGGTTGC	1200
CCCGCCTGCC	CCAGCGCTAC	TGGCAAATGC	GGCCCCTGTT	TCTGGAGCTG	CTTGGGAACC	1260
ACGCGCAGTG	CCCCTACGGG	GTGCTCCTCA	AGACGCACTG	CCCGCTGCGA	GCTGCGGTCA	1320
CCCCAGCAGC	CGGTGTCTGT	GCCCGGGAGA	AGCCCCAGGG	CTCTGTGGCG	GCCCCGAGG	1380
AGGAGGACAC	AGACCCCCGT	CGCCTGGTGC	AGCTGCTCCG	CCAGCACAGC	AGCCCCTGGC	1440
AGGTGTACGG	CTTCGTGCGG	GCCTGCCTGC	GCCGGCTGGT	GCCCCCAGGC	CTCTGGGGCT	1500
CCAGGCACAA	CGAACGCCGC	TTCCTCAGGA	ACACCAAGAA	GTTCATCTCC	CTGGGGAAGC	1560
ATGCCAAGCT	CTCGCTGCAG	GAGCTGACGT	GGAAGATGAG	CGTGCGGGAC	TGCGCTTGGC	1620
TGCGCAGGAG	CCCAGGGGTT	GGCTGTGTTC	CGGCCGCAGA	GCACCGTCTG	CGTGAGGAGA	1680
TCCTGGCCAA	GTTCCTGCAC	TGGCTGATGA	GTGTGTACGT	CGTCGAGCTG	CTCAGGTCTT	1740
TCTTTTATGT	CACGGAGACC	ACGTTTCAAA	AGAACAGGCT	CTTTTTCTAC	CGGAAGAGTG	1800
TCTGGAGCAA	GTTGCAAAGC	ATTGGAATCA	GACAGCACTT	GAAGAGGGTG	CAGCTGCGGG	1860
AGCTGTCGGA	AGCAGAGGTC	AGGCAGCATC	GGGAAGCCAG	GCCCGCCCTG	CTGACGTCCA	1920
GACTCCGCTT	CATCCCCAAG	CCTGACGGGC	TGCGGCCGAT	TGTGAACATG	GACTACGTCG	1980
TGGGAGCCAG	AACGTTCCGC	AGAGAAAAGA	GGGCCGAGCG	TCTCACCTCG	AGGGTGAAGG	2040
CACTGTTCAG	CGTGCTCAAC	TACGAGCGGG	cecececcc	CGGCCTCCTG	GGCGCCTCTG	2100
TGCTGGGCCT	GGACGATATC	CACAGGGCCT	GGCGCACCTT	CGTGCTGCGT	GTGCGGGCCC	2160
AGGACCCGCC	GCCTGAGCTG	TACTTTGTCA	AGGTGGATGT	GACGGGCGCG	TACGACACCA	2220

TCCCCCAGGA	CAGGCTCACG	GAGGTCATCG	CCAGCATCAT	CAAACCCCAG	AACACGTACT	2280
GCGTGCGTCG	GTATGCCGTG	GTCCAGAAGG	CCGCCCATGG	GCACGTCCGC	AAGGCCTTCA	2340
AGAGCCACGT	CTCTACCTTG	ACAGACCTCC	AGCCGTACAT	GCGACAGTTC	GTGGCTCACC	2400
TGCAGGAGAC	CAGCCCGCTG	AGGGATGCCG	TCGTCATCGA	GCAGAGCTCC	TCCCTGAATG	2460
AGGCCAGCAG	TGGCCTCTTC	GACGTCTTCC	TACGCTTCAT	GTGCCACCAC	GCCGTGCGCA	2520
TCAGGGGCAA	GTCCTACGTC	CAGTGCCAGG	GGATCCCGCA	GGGCTCCATC	CTCTCCACGC	2580
TGCTCTGCAG	CCTGTGCTAC	GGCGACATGG	AGAACAAGCT	GTTTGCGGGG	ATTCGGCGGG	2640
ACGGGCTGCT	CCTGCGTTTG	GTGGATGATT	TCTTGTTGGT	GACACCTCAC	CTCACCCACG	2700
CGAAAACCTT	CCTCAGGACC	CTGGTCCGAG	GTGTCCCTGA	GTATGGCTGC	GTGGTGAACT	2760
TGCGGAAGAC	AGTGGTGAAC	TTCCCTGTAG	AAGACGAGGC	CCTGGGTGGC	ACGGCTTTTG	2820
TTCAGATGCC	GGCCCACGGC	CTATTCCCCT	GGTGCGGCCT	GCTGCTGGAT	ACCCGGACCC	2880
TGGAGGTGCA	GAGCGACTAC	TCCAGCTATG	CCCGGACCTC	CATCAGAGCC	AGTCTCACCT	2940
TCAACCGCGG	CTTCAAGGCT	GGGAGGAACA	TGCGTCGCAA	ACTCTTTGGG	GTCTTGCGGC	3000
TGAAGTGTCA	CAGCCTGTTT	CTGGATTTGC	AGGTGAACAG	CCTCCAGACG	GTGTGCACCA	3060
АСАТСТАСАА	GATCCTCCTG	CTGCAGGCGT	ACAGGTTTCA	CGCATGTGTG	CTGCAGCTCC	3120
CATTTCATCA	GCAAGTTTGG	AAGAACCCCA	CATTTTTCCT	GCGCGTCATC	TCTGACACGG	3180
CCTCCCTCTG	CTACTCCATC	CTGAAAGCCA	AGAACGCAGG	GATGTCGCTG	GGGGCCAAGG	3240
GCGCCGCCGG	CCCTCTGCCC	TCCGAGGCCG	TGCAGTGGCT	GTGCCACCAA	GCATTCCTGC	3300
TCAAGCTGAC	TCGACACCGT	GTCACCTACG	TGCCACTCCT	GGGGTCACTC	AGGACAGCCC	3360
AGACGCAGCT	GAGTCGGAAG	CTCCCGGGGA	CGACGCTGAC	TGCCCTGGAG	GCCGCAGCCA	3420
ACCCGGCACT	GCCCTCAGAC	TTCAAGACCA	TCCTGGACTG	ATGGCCACCC	GCCCACAGCC	3480
AGGCCGAGAG	CAGACACCAG	CAGCCCTGTC	ACGCCGGGCT	CTACGTCCCA	GGGAGGGAGG	3540
GGCGGCCCAC	ACCCAGGCCC	GCACCGCTGG	GAGTCTGAGG	CCTGAGTGAG	TGTTTGGCCG	3600
AGGCCTGCAT	GTCCGGCTGA	AGGCTGAGTG	TCCGGCTGAG	GCCTGAGCGA	GTGTCCAGCC	3660
AAGGGCTGAG	TGTCCAGCAC	ACCTGCCGTC	TTCACTTCCC	CACAGGCTGG	CGCTCGGCTC	3720
CACCCCAGGG	CCAGCTTTTC	CTCACCAGGA	GCCCGGCTTC	CACTCCCCAC	ATAGGAATAG	3780
TCCATCCCCA	GATTCGCCAT	TGTTCACCCC	TCGCCCTGCC	CTCCTTTGCC	TTCCACCCCC	3840
ACCATCCAGG	TGGAGACCCT	GAGAAGGACC	CTGGGAGCTC	TGGGAATTTG	GAGTGACCAA	3900
AGGTGTGCCC	: TGTACACAGG	CGAGGACCCT	GCACCTGGAT	GGGGGTCCCT	GTGGGTCAAA	3960
TTGGGGGGAG	GTGCTGTGGG	AGTAAAATAC	TGAATATATG	AGTTTTTCAG	TTTTGAAAAA	4020
AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	AA				4042

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) L□NGE: 1132 Aminos,uren
 - (B) ART: Aminos,ure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKŠLS: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRŠNLICHE HERKUNFT:
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:
- Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser 1 5 10 15
- His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30
- Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg 35 40 45
- Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro 50 60
- Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu 65 70 75 80
- Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val 85 90 95
- Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro 100 105 110
- Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr 115 120 125
- Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val 130 135 140
- Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val 145 150 155
- Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr 165 170 175
- Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly 180 185 190
- Pro Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg 195 200 205
- Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg

210 215 220 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg 230 235 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val 265 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro 345 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln 375 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His 395 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met 505 Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys 520 Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe 535

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe 545 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His 585 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln 600 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp 760 Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp 835 Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu

855

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala 865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys 885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu 900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe 915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser 930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe 945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly 965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn 980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Gln 995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln 1010 1015 1020 .

Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala 1025 1030 1035 1040

Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu 1045 1050 1055

Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp 1060 1065 1070

Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr 1075 1080 1085

Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser 1090 1095 1100

Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Asn 1105 1110 1115 1120

Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp 1125 1130

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LONGE: 1153 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKŠLS: cDNA

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRŠNLICHE HERKUNFT:
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

60	CATGTCCTCG	TTGCCTGTTG	GATTCTCCAC	GGTGCACTCT	AGACCCGTCT	GTGCCTGCAG
120	GTGTGTGTTG	TTCCTGCCGA	CCATGTGCGT	TCTTGGGTTG	TCTCACCACC	TTCCCTTGTT
180	CTTAGTGTTA	TTTCTCTTTG	TTTGCTTTTA	TCACTGGGCA	TGCCTCCTGG	ATCCTCTCGT
240	TCACTCTGTC	TGAGACAGTC	TTTTGTTTAT	CGTTGTTTGC	TTTTTATTGT	CCCCCTGATC
300	TCCTCGGTTC	AACCTCTGCC	GGCTCACTGC	GCACAATCTC	GAGTGTAATG	ACCCAGGCTG
360	ACCACCACGC	ACAGGCGCCC	AGCTGGGATT	CCTCATGAGT	CATTCCTCAA	AAGCAGTTCT
420	AGGCTGGTCT	CATGTTGGCC	AGGCTTTCAC	TAGTAGAGAT	TTTGTATTTT	CTGGCTAATT
480	GGATTACAGG	CACAGTGCTG	CTTGGCCTCC	ATCTGCCCGC	ACCTCAAGTG	CAAACTCCTG
540	ACATTGCTAC	GAAGTCTGAA	CTTTTAAAAT	ATACCTTGAT	CGTGCCCGGC	TGCAAGCCAC
600	CCAGCCTGTG	TGGCCACCCC	ATTTTAGCTC	CCCTTAGTGT	AGCAATAAGA	CCTTGTCCTG
660	ACAAGCTAAG	TGACACCCCC	TCAGGCATCT	TAGTTCTATC	CCTGCTGACT	TGCTGTTTTC
720	CCCTGCTTTT	TTTGCCCCCG	TTTCTTTAGC	GTGTTGAGTG	ATTGTTTTCC	САТТАТТААТ
780	CCCTTCCTTG	GTCTGGGGTC	CAGGCCCGCC	TCTTCTGTCT	TCCCCGTCTG	CCTCCTTTGT
840	CCTGTGCTGG	CCCAGCTTTA	GCTGGTAAAC	TCTTGTTATT	GGTTCTTCTG	TCCTTTGCGT
900	TGAAGATGTG	GATGCACAGA	CTCTGCTTAT	GTCCGGGGAC	ATCTAGCGAC	CCTCCATGGC
960	ACGTGGCCAG	CTGGAGCACC	CCGTGAGTGT	TCATCTTGGC	AGGAGGGCGG	GAGACTCACG
1020	TGAGGAGATC	ACCGTCTGCG	GCCGCAGAGC	CTGTGTTCCG	CCAGGGTTGG	CGTTCCTTAG
1080	CAGGTCTTTC	TCGAGCTGCT	GTGTACGTCG	GCTGATGAGT	TCCTGCACTG	CTGGCCAAGT
1140	GAAGAGTGTC	TTTTCTACCG	AACAGGCTCT	GTTTCAAAAG	CGGAGACCAC	TTTTATGTCA
1153					TGC	TGGAGCAAGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) L□NGE: 412 Basenpaare

 - (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKŠLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv)	ANTI	SENSE:	NEIN
------	------	--------	------

(vi) URSPRŠNLICHE HERKUNFT:

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CAGAGCCCTG	GTCCTCCTGT	CTCCATCGTC	ACGTGGGCAC	ACGTGGCTTT	TCGCTCAGGA	60
CGTCGAGTGG	ACACGGTGAT	CTCTGCCTCT	GCTCTCCCTC	CTGTCCAGTT	TGCATAAACT	120
TACGAGGTTC	ACCTTCACGT	TTTGATGGAC	ACGCGGTTTC	CAGGCACCGA	GGCCAGAGCA	180
GTGAACAGAG	GAGGCTGGGC	GCGGCAGTGG	AGCCGGGTTG	CCGGCAATGG	GGAGAAGTGT	240
CTGGAAGCAC	AGACGCTCTG	GCGAGGGTGC	CTGCAGAGAC	CCGCCTGGTG	CACTCTGATT	300
CTCCACTTGC	CTGTTGCATG	TCCTCGTTCC	CTTGTTTCTC	ACCACCTCTT	GGGTTGCCAT	360
GTGCGTTTCC	TGCCGAGTGT	GTGTTGATCC	TCTCGTTGCC	TCCTGGTCAC	TG	412

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LONGE: 1012 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKŠLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRŠNLICHE HERKUNFT:
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGGGTCCT	'GG	GCCCACCCGG	GCAGGACGCG	TGGACCGAGT	GACCGTGGTT	TCTGTGTGGT	60
GTCACCTG	SCC	AGACCCGCCG	AAGAAGCCAC	CTCTTTGGAG	GGTGCGCTCT	CTGGCACGCG	120
CCACTCCC	CAC	CCATCCGTGG	GCCGCCAGCA	CCACGCGGGC	CCCCCATCCA	CATCGCGGCC	180
ACCACGTO	CCC	TGGGACACGC	CTTGTCCCCC	GGTGTACGCC	GAGACCAAGC	ACTTCCTCTA	240
CTCCTCAG	GC	GACAAGGAGC	AGCTGCGGCC	CTCCTTCCTA	CTCAGCTCTC	TGAGGCCCAG	300
CCTGACT	GGC	GCTCGGAGGC	TCGTGGAGAC	CATCTTTCTG	GGTTCCAGGC	CCTGGATGCC	360
AGGGACTO	ccc	CGCAGGTTGC	CCCGCCTGCC	CCAGCGCTAC	TGGCAAATGC	GGCCCCTGTT	420
TCTGGAGG	CTG	CTTGGGAACC	ACGCGCAGTG	CCCCTACGGG	GTGCTCCTCA	AGACGCACTG	480
CCCGCTGC	CGA	GCTGCGGTCA	CCCCAGCAGC	CGGTGTCTGT	GCCCGGGAGA	AGCCCCAGGG	540

CTCTGTGGCG	GCCCCGAGG	AGGAGGACAC	AGACCCCCGT	CGCCTGGTGC	AGCTGCTCCG	600
CCAGCACAGC	AGCCCCTGGC	AGGTGTACGG	CTTCGTGCGG	GCCTGCCTGC	GCCGGCTGGT	660
GCCCCAGGC	CTCTGGGGCT	CCAGGCACAA	CGAACGCCGC	TTCCTCAGGA	ACACCAAGAA	720
GTTCATCTCC	CTGGGGAAGC	ATGCCAAGCT	CTCGCTGCAG	GAGCTGACGT	GGAAGATGAG	780
CGTGCGGGAC	TGCGCTTGGC	TGCGCAGGAG	CCCAGGTGAG	GAGGTGGTGG	CCGTCGAGGG	840
CCCAGGCCCC	AGAGCTGAAT	GCAGTAGGGG	CTCAGAAAAG	GGGGCAGGCA	GAGCCCTGGT	900
CCTCCTGTCT	CCATCGTCAC	GTGGGCACAC	GTGGCTTTTC	GCTCAGGACG	TCGAGTGGAC	960
ACGGTGATCT	CTGCCTCTGC	TCTCCCTCCT	GTCCAGTTTG	CATAAACTTA	CG	1012

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LUNGE: 3972 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKŠLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRŠNLICHE HERKUNFT:
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GTTTCAGGCA GCGCTGCGTC CTGCTGCGCA CGTGGGAAGC 60 CCTGGCCCCG GCCACCCCG CGATGCCGCG CGCTCCCCGC TGCCGAGCCG TGCGCTCCCT 120 GCTGCGCAGC CACTACCGCG AGGTGCTGCC GCTGGCCACG TTCGTGCGGC GCCTGGGGCC 180 CCAGGGCTGG CGGCTGGTGC AGCGCGGGGA CCCGGCGGCT TTCCGCGCGC TGGTGGCCCA 240 GTGCCTGGTG TGCGTGCCCT GGGACGCACG GCCGCCCCCC GCCGCCCCCT CCTTCCGCCA 300 GGTGTCCTGC CTGAAGGAGC TGGTGGCCCG AGTGCTGCAG AGGCTGTGCG AGCGCGGCGC 360 GAAGAACGTG CTGGCCTTCG GCTTCGCGCT GCTGGACGGG GCCCGCGGGG GCCCCCCCGA 420 GGCCTTCACC ACCAGCGTGC GCAGCTACCT GCCCAACACG GTGACCGACG CACTGCGGGG 480 GAGCGGGGC TGGGGGCTGC TGCTGCGCCG CGTGGGCGAC GACGTGCTGG TTCACCTGCT 540 GGCACGCTGC GCGCTCTTTG TGCTGGTGGC TCCCAGCTGC GCCTACCAGG TGTGCGGGCC 600 660 720 CCGAAGGCGT CTGGGATGCG AACGGGCCTG GAACCATAGC GTCAGGGAGG CCGGGGTCCC

CCTGGGCCTG CCAGCCCCGG	GTGCGAGGAG	GCGCGGGGC	AGTGCCAGCC	GAAGTCTGCC	780
GTTGCCCAAG AGGCCCAGGC	GTGGCGCTGC	CCCTGAGCCG	GAGCGGACGC	CCGTTGGGCA	840
GGGGTCCTGG GCCCACCCGG	GCAGGACGCG	TGGACCGAGT	GACCGTGGTT	TCTGTGTGGT	900
GTCACCTGCC AGACCCGCCG	AAGAAGCCAC	CTCTTTGGAG	GGTGCGCTCT	CTGGCACGCG	960
CCACTCCCAC CCATCCGTGG	GCCGCCAGCA	CCACGCGGGC	CCCCCATCCA	CATCGCGGCC	1020
ACCACGTCCC TGGGACACGC	CTTGTCCCCC	GGTGTACGCC	GAGACCAAGC	ACTTCCTCTA	1080
CTCCTCAGGC GACAAGGAGC	AGCTGCGGCC	CTCCTTCCTA	CTCAGCTCTC	TGAGGCCCAG	1140
CCTGACTGGC GCTCGGAGGC	TCGTGGAGAC	CATCTTTCTG	GGTTCCAGGC	CCTGGATGCC	1200
AGGGACTCCC CGCAGGTTGC	CCCGCCTGCC	CCAGCGCTAC	TGGCAAATGC	GGCCCCTGTT	1260
TCTGGAGCTG CTTGGGAACC	ACGCGCAGTG	CCCCTACGGG	GTGCTCCTCA	AGACGCACTG	1320
CCCGCTGCGA GCTGCGGTCA	CCCCAGCAGC	CGGTGTCTGT	GCCCGGGAGA	AGCCCCAGGG	1380
CTCTGTGGCG GCCCCGAGG	AGGAGGACAC	AGACCCCCGT	CGCCTGGTGC	AGCTGCTCCG	1440
CCAGCACAGC AGCCCCTGGC	AGGTGTACGG	CTTCGTGCGG	GCCTGCCTGC	GCCGGCTGGT	1500
GCCCCAGGC CTCTGGGGCT	CCAGGCACAA	CGAACGCCGC	TTCCTCAGGA	ACACCAAGAA	1560
GTTCATCTCC CTGGGGAAGC	ATGCCAAGCT	CTCGCTGCAG	GAGCTGACGT	GGAAGATGAG	1620
CGTGCGGGAC TGCGCTTGGC	TGCGCAGGAG	CCCAGGTGAG	GAGGTGGTGG	CCGTCGAGGG	1680
CCCAGGCCCC AGAGCTGAAT	GCAGTAGGGG	CTCAGAAAAG	GGGGCAGGCA	GAGCCCTGGT	1740
CCTCCTGTCT CCATCGTCAC	GTGGGCACAC	GTGGCTTTTC	GCTCAGGACG	TCGAGTGGAC	1800
ACGGTGATCT CTGCCTCTGC	TCTCCCTCCT	GTCCAGTTTG	CATAAACTTA	CGAGGTTCAC	1860
CTTCACGTTT TGATGGACAC	GCGGTTTCCA	GGCGCCGAGG	CCAGAGCAGT	GAACAGAGGA	1920
GGCTGGGCGC GGCAGTGGAG	CCGGGTTGCC	GGCAATGGGG	AGAAGTGTCT	GGAAGCACAG	1980
ACGCTCTGGC GAGGGTGCCT	GCAGGGGTTG	GCTGTGTTCC	GGCCGCAGAG	CACCGTCTGC	2040
GTGAGGAGAT CCTGGCCAAG	TTCCTGCACT	GGCTGATGAG	TGTGTACGTC	GTCGAGCTGC	2100
TCAGGTCTTT CTTTTATGTC	ACGGAGACCA	CGTTTCAAAA	GAACAGGCTC	TTTTTCTACC	2160
GGAAGAGTGT CTGGAGCAAG	TTGCAAAGCA	TTGGAATCAG	ACAGCACTTG	AAGAGGGTGC	2220
AGCTGCGGGA GCTGTCGGAA	GCAGAGGTCA	GGCAGCATCG	GGAAGCCAGG	CCCGCCCTGC	2280
TGACGTCCAG ACTCCGCTTC	ATCCCCAAGC	CTGACGGGCT	GCGGCCGATT	GTGAACATGG	2340
ACTACGTCGT GGGAGCCAGA	ACGTTCCGCA	GAGAAAAGAG	GGTGGCTGTG	CTTTGGTTTA	2400
ACTTCCTTTT TAAACAGAAG	TGCGTTTGAG	CCCCACATTT	GGTATCAGCT	TAGATGAAGG	2460
GCCCGGAGGA GGGGCCACGG	GACACAGCCA	GGGCCATGGC	ACGGCGCCAA	CCCATTTGTG	2520

CGCACGGTGA	GGTGGCCGAG	GTGCCGGTGC	CTCCAGAAAA	GCAGCGTGGG	GGTGTAGGGG	2580
GAGCTCCTGG	GGCAGGGACA	GGCTCTGAGG	ACCACAAGAA	GCAGCTGGGC	CAGGGCCTGG	2640
ATGCAGCACG	GCCCGAGCGG	GTGGGGGCCC	ACCACGCCAT	TCTGGTCAAA	GGTGTTGTAG	2700
TCGTAATAGC	CGGCCCAGGC	GCTCTGAACC	TTCAGAGTCT	CAAAAGCTGG	GACCCTCAGG	2760
GCCAAATGGG	GCCACACCTT	GTCCTGGAAG	AAATCATGGT	CCACTTCCAG	GTTCGCCGGG	2820
TCCGGTTCTT	CCTGCTCAGT	GGGGCTACGA	CCACCTAGGT	AGTTGCTACC	TAATCCTTCC	2880
CGGCGAAAAT	AGGCTCCACT	GGTGTCTGCA	ACAAGCGGAG	TCTCTAGGCC	TGGTCCCTGG	2940
GGGCAGTGCC	ACACATACAC	ATACCTTTTC	CTCGGCTCCA	CAGGTAGCTT	GGTGCCCTGC	3000
AGGGTGCCAG	GCGGCCCCTC	TCCAACACCA	GCCAGTGCTG	CGATTTGCGC	AGACCAGGCT	3060
CCGGCTGCGT	TGATCACAAT	GGCGCATTCC	ACAGGCTGGT	ACTCCAGGCT	GCGGTCCATC	3120
TTCACATGGA	CTTCATGGAT	CCTTTTCAAG	ACCACCGCTT	TGTCATCTGT	GGTCAACATG	3180
CGTTGAGATG	AAGAGACAAA	ACGTGTCACC	TCTCCCTGGC	AGAAAAGGAC	TCCCAAGGAC	3240
TGGACCTTTC	GCCGAAGCCC	CTGGAGCAGA	CACCAGGGGT	CAAACCAACC	TTCGTCCTCC	3300
ATCCCATAAG	ACGCCAAAGC	CACTCCCTCT	GTGTTTATCC	AGGGAAACTT	GTTCCGAAGC	3360
TGATCAGGAG	ACATCAGAGA	AACTTTGGCT	CCCTCCTGCC	TCTGCACTTT	CACGTTGCTC	3420
TCCATGGCTG	CAGCATCCTT	TTCTGAAGCC	AGCAAGAGGT	AGCCCGAGGG	GTTGAACCGG	3480
AGGTCCAGGG	GAGGAGCATC	GACTACGGCC	AGGTACTCAT	TGATGTTCCG	TAGAAAGCTG	3540
GCTGAAAAGA	GGGAGAGCTG	GATGTTCTCA	GGCAATGAGA	ACTGCTGACA	AATCCCACCT	3600
ACTGAGAGCC	CAGTGGAGGC	CTGTGAATAC	GTGTGGTCCC	GTTCCACCAC	TAGCACTCGA	3660
ATAGCACCTC	GTCTGCTCTC	CAGCTTCTTC	AGCCAATAGG	CCACAGACAA	GCCAAGCACC	3720
CCACCTCCCA	CGATCACCAC	ATCCGAGTGC	TCGGGAGGCA	GGTGGCTGGT	GTCTTGCAGT	3780
AGATCACAGG	ACCTTCCAGG	CAGGATCGAC	TTGATCTTCT	TCTTAATCTC	AGACACCTTT	3840
CCATCCCAGT	CCAGAGAAAA	GCCTCCTCTG	CGCGTGCCTG	GCCTCCGGGT	CAAGAGGCCC	3900
CGGCCCATGC	CGTGCGGCAG	AACCCTCCGA	ATCATAGCCC	CTCTGAGCCC	GGGTCGACGC	3960
GGCCGCGAAT	TC					3972

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LONGE: 2089 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKŠLS: cDNA
- (v) ART DES FRAGMENTS: linear

(vi) URSPR\$NLICHE HERKUNFT: (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Human

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCGGAAGAGT	GTCTGGAGCA	AGTTGCAAAG	CATTGGAATC	AGACAGCACT	TGAAGAGGGT	60
GCAGCTGCGG	GAGCTGTCGG	AAGCAGAGGT	CAGGCAGCAT	CGGGAAGCCA	GGCCCGCCCT	120
GCTGACGTCC	AGACTCCGCT	TCATCCCCAA	GCCTGACGGG	CTGCGGCCGA	TTGTGAACAT	180
GGACTACGTC	GTGGGAGCCA	GAACGTTCCG	CAGAGAAAAG	AGGGCCGAGC	GTCTCACCTC	240
GAGGGTGAAG	GCACTGTTCA	GCGTGCTCAA	CTACGAGCGG	GCGCGGCGCC	CCGGCCTCCT	300
GGGCGCCTCT	GTGCTGGGCC	TGGACGATAT	CCACAGGGCC	TGGCGCACCT	TCGTGCTGCG	360
TGTGCGGGCC	CAGGACCCGC	CGCCTGAGCT	GTACTTTGTC	AAGGTGGATG	TGACGGGCGC	420
GTACGACACC	ATCCCCCAGG	ACAGGCTCAC	GGAGGTCATC	GCCAGCATCA	TCAAACCCCA	480
GAACACGTAC	TGCGTGCGTC	GGTATGCCGT	GGTCCAGAAG	GCCGCCCATG	GGCACGTCCG	540
CAAGGCCTTC	AAGAGCCACG	TCTCTACCTT	GACAGACCTC	CAGCCGTACA	TGCGACAGTT	600
CGTGGCTCAC	CTGCAGGAGA	CCAGCCCGCT	GAGGGGTGCC	GTCGTCATCG	AGCAGAGCTC	660
CTCCCTGAAT	GAGGCCAGCA	GTGGCCTCTT	CGACGTCTTC	CTACGCTTCA	TGTGCCACCA	720
CGCCGTGCGC	ATCAGGGGCA	AGTCCTACGT	CCAGTGCCAG	GGGATCCCGC	AGGGCTCCAT	780
CCTCTCCACG	CTGCTCTGCA	GCCTGTGCTA	CGGCGACATG	GAGAACAAGC	TGTTTGCGGG	840
GATTCGGCGG	GACGGGCTGC	TCCTGCGTTT	GGTGGATGAT	TTCTTGTTGG	TGACACCTCA	900
CCTCACCCAC	GCGAAAACCT	TCCTCAGGAC	CCTGGTCCGA	GGTGTCCCTG	AGTATGGCTG	960
CGTGGTGAAC	TTGCGGAAGA	CAGTGGTGAA	CTTCCCTGTA	GAAGACGAGG	CCCTGGGTGG	1020
CACGGCTTTT	GTTCAGATGC	CGGCCCACGG	CCTATTCCCC	TGGTGCGGCC	TGCTGCTGGA	1080
TACCCGGACC	CTGGAGGTGC	AGAGCGACTA	CTCCAGCTAT	GCCCGGACCT	CCATCAGAGC	1140
CAGTCTCACC	TTCAACCGCG	GCTTCAAGGC	TGGGAGGAAC	ATGCGTCGCA	AACTCTTTGG	1200
GGTCTTGCGG	CTGAAGTGTC	ACAGCCTGTT	TCTGGATTTG	CAGGTGAACA	GCCTCCAGAC	1260
GGTGTGCACC	AACATCTACA	AGATCCTCCT	GCTGCAGGCG	TACAGGTTTC	ACGCATGCGT	1320
GCTGCAGCTC	CCATTTCATC	AGCAAGTTTG	GAAGAACCCC	ACATTTTTCC	TGCGCGTCAT	1380
CTCTGACACG	GCCTCCCTCT	GCTACTCCAT	CCTGAAAGCC	AAGAACGCAG	GTATGTGCAG	1440
GTGCCTGGCC	TCAGTGGCAG	CAGTGCCTGC	CTGCTGGTGT	TAGTGTGTCA	GGAGACTGAG	1500
TGAATCTGGG	CTTAGGAAGT	TCTTACCCCT	TTTCGCATCA	GGAAGTGGTT	TAACCCAACC	1560
ACTGTCAGGC	TCGTCTGCCC	GCCCTCTCGT	GGGGTGAGCA	GAGCACCTGA	TGGAAGGGAC	1620

AGGAGCTGTC	TGGGAGCTGC	CATCCTTCCC	ACCTTGCTCT	GCCTGGGGAA	GCGCTGGGGG	1680
GCCTGGTCTC	TCCTGTTTGC	CCCATGGTGG	GATTTGGGGG	GCCTGGCCTC	TCCTGTTTGC	1740
CCTGTGGTGG	GATTGGGCTG	TCTCCCGTCC	ATGGCACTTA	GGGCCCTTGT	GCAAACCCAG	1800
GCCAAGGGCT	TAGGAGGAGG	CCAGGCCCAG	GCTACCCCAC	CCCTCTCAGG	AGCAGAGGCC	1860
GCGTATCACC	ACGACAGAGC	CCCGCGCCGT	CCTCTGCTTC	CCAGTCACCG	TCCTCTGCCC	1920
CTGGACACTT	TGTCCAGCAT	CAGGGAGGTT	TCTGATCCGT	CTGAAATTCA	AGCCATGTCG	1980
AACCTGCGGT	CCTGAGCTTA	ACAGCTTCTA	CTTTCTGTTC	TTTCTGTGTT	GTGGAGACCC	2040
TGAGAAGGAC	CCTGGGAGCT	CTGGGAATTT	GGAGTGACCA	AAGGTGTGC		2089

<u>Patentansprüche</u>

5

20

25

- 1. Katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit, ihre funktionellen Äquivalente, ihre Varianten und ihre katalytisch aktiven Fragmente.
- 2. Telomerase gemäß Anspruch 1, enthaltend die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 2 oder deren funktionelle Äquivalente.
- Nucleinsäuresequenzen codierend für Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 und 2
 und ihre funktionellen Äquivalente.
 - 4. Nucleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 3, enthaltend die DNA-Sequenz aus Abb. 1 oder ihre funktionellen Äquivalente.
- Antisense-Nucleinsäuresequenz bindend an die Nucleinsäuresequenz gemäß
 Anspruch 3 oder 4.
 - 6. Antikörper gegen Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, gegebenenfalls markiert mit einem oder mehreren Markern.
 - 7. Verwendung von Nucleinsäuresequenzen gemäß den Ansprüchen 3 und 4 zur Herstellung von Telomerase.
 - 8. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Diagnose.
 - 9. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Herstellung von Arzneimitteln.
- 10. Vektor enthaltend eine Nucleinsäuresequenz, insbesondere DNA, gemäß Anspruch 30 3 und 4.
 - 11. Mikroorganismen enthaltend den Vektor gemäß Anspruch 10.

- 12. Screening Assay zur Auffindung von Modulatoren der humanen Telomerase enthaltend die Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2.
- Verfahren zur Herstellung der Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man den Mikroorganismus gemäß Anspruch 11 kultiviert und die Telomerase isoliert.

WO 98/59040 PCT/EP98/03468

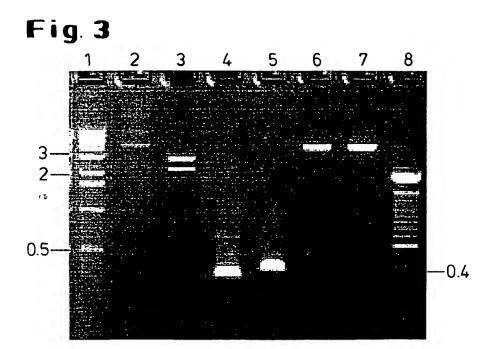
Fig. 1

- 1 / 15 -

GTTTCAGGCA	GCGCTGCGTC	CTGCTGCGCA	CGTGGGAAGC	CCTGGCCCCG	GCCACCCCCG	CGATGCCGCG	70
CGCTCCCCGC	TGCCGAGCCG	TGCGCTCCCT	GCTGCGCAGC	CACTACCGCG	AGGTGCTGCC	GCTGGCCACG	140
					CCCGGCGGCT		210
					GCCGCCCCT		280
					AGCGCGGCGC		350
					GGCCTTCACC		420
					TGGGGGCTGC		490
					TGCTGGTGGC		560
					GGCCCGGCCC		630
					GTCAGGGAGG		700
					GAAGTCTGCC		770
					GGGGTCCTGG		840
					AGACCCGCCG		910
					GCCGCCAGCA		980
					GGTGTACGCC		1050
					CTCAGCTCTC		
					CCTGGATGCC		
					TCTGGAGCTG		
					GCTGCGGTCA		
					AGGAGGACAC		
					CTTCGTGCGG		
CCCCCCCCCC	GCCCCCAGGC	CTCTGGGGCT	CCAGGCACAA	CGAACGCCGC	TTCCTCAGGA	ACACCAAGAA	1540
GTTCNTCTCC	CTGGGGAAGC	ATGCCAAGCT	CTCGCTGCAG	GAGCTGACGT	GGAAGATGAG	CGTGCGGGAC	1610
					GCACCGTCTG		
TCCTCCCCAA	GTTCCTGCAC	TGGCTGATGA	GTGTGTACGT	CGTCGAGCTG	CTCAGGTCTT	TCTTTTATGT	1750
					TCTGGAGCAA		
					AGCAGAGGTC		
					CCTGACGGGC		
TGTGNACATG	GACTACGTCG	TGGGAGCCAG	AACGTTCCGC	AGAGAAAAGA	GGGCCGAGCG	TCTCACCTCG	2030
					CGGCCTCCTG		
					GTGCGGGCCC		
COCTORCE	TA CTTTTCA	ACCTCGATCT	GACGCGCGCG	TACGACACCA	TCCCCAGGA	CAGGCTCACG	2240
					GTATGCCGTG		
					ACAGACCTCC		
					TCGTCATCGA		
					GTGCCACCAC		
					CTCTCCACGC		
					ACGGGCTGCT		
					CCTCAGGACC		
					TTCCCTGTAG		
CCTGGGTGGC	ACCCCTTTTG	TTCAGATGCC	GGCCCACGGC	CTATTCCCCT	GGTGCGGCCT	GCTGCTGGAT	2870
ACCCGGACCC	TGGAGGTGCA	GAGCGACTAC	TCCAGCTATG	CCCGGACCTC	CATCAGAGCC	AGTCTCACCT	2940
TCAACCGCGG	CTTCAAGGCT	GGGAGGAACA	TGCGTCGCAA	ACTCTTTGGG	GTCTTGCGGC	TGAAGTGTCA	3010
					ACATCTACAA		
					GCAAGTTTGG		
					CTGAAAGCCA		
CATTITICCT	GGGGCCAAGG	GCGCCGCCGG	CCCTCTGCCC	TCCGAGGCCG	TGCAGTGGCT	GTGCCACCAA	3290
GCATTCCTGC	TCAAGCTGAC	TCGACACCGT	GTCACCTACG	TGCCACTCCT	GGGGTCACTC	AGGACAGCCC	3360
AGACGCAGCT	GAGTCGGAAG	CTCCCGGGGA	CGACGCTGAC	TGCCCTGGAG	GCCGCAGCCA	ACCCGGCACT	3430
					AGGCCGAGAG		
					ACCCAGGCCC		
					AGGCTGAGTG		
					TTCACTTCCC		
					CACTCCCCAC		
					TTCCACCCC		
TOCATOCCCA	CHENNESPEC	CTCCCACCTC	TGGGAATTTG	GAGTGACCAA	AGGTGTGCCC	TGTACACAGG	3920
					GTGCTGTGGG		
			AAAAAAAAA				4042
TOWNINING	MATITITION		***************************************				

Fig. 2

MPRAPRCRAV	RSLLRSHYRE	VLPLATFVRR	LGPQGWRLVQ	RGDPAAFRAL	50
VAQCLVCVPW	DARPPPAAPS	FRQVSCLKEL	VARVLQRLCE	RGAKNVLAFG	100
FALLDGARGG	PPEAFTTSVR	SYLPNTVTDA	LRGSGAWGLL	LRRVGDDVLV	150
HLLARCALFV	LVAPSCAYQV	CGPPLYQLGA	ATQARPPPHA	SGPRRRLGCE	200
RAWNHSVREA	GVPLGLPAPG	ARRRGGSASR	SLPLPKRPRR	GAAPEPERTP	250
VGQGSWAHPG	RTRGPSDRGF	CVVSPARPAE	EATSLEGALS	GTRHSHPSVG	300
RQHHAGPPST	SRPPRPWDTP	CPPVYAETKH	FLYSSGDKEQ	LRPSFLLSSL	350
RPSLTGARRL	VETIFLGSRP	WMPGTPRRLP	RLPQRYWQMR	PLFLELLGNH	400
AQCPYGVLLK	THCPLRAAVT	PAAGVCAREK	PQGSVAAPEE	EDTDPRRLVQ	450
LLRQHSSPWQ	VYGFVRACLR	RLVPPGLWGS	RHNERRFLRN	TKKFISLGKH	500
AKLSLQELTW	KMSVRDCAWL	RRSPGVGCVP	AAEHRLREEI	LAKFLHWLMS	550
VYVVELLRSF	FYVTETTFQK	NRLFFYRKSV	WSKLQSIGIR	QHLKRVQLRE	600
LSEAEVROHR	EARPALLTSR	LRFIPKPDGL	RPIVNMDYVV	GARTFRREKR	650
AERLTSRVKA	LFSVLNYERA	RRPGLLGASV	LGLDDIHRAW	RTFVLRVRAQ	700
${\tt DPPPELYFVK}$	VDVTGAYDTI	PQDRLTEVIA	SIIKPQNTYC	VRRYAVVQKA	750
AHGHVRKAFK	SHVSTLTDLQ	PYMRQFVAHL	QETSPLRDAV	VIEQSSSLNE	800
ASSGLFDVFL	RFMCHHAVRI	RGKSYVQCQG	IPQGSILSTL	LCSLCYGDME	850
NKLFAGIRRD	GLLLRLVDDF	LLVTPHLTHA	KTFLRTLVRG	VPEYGCVVNL	900
RKTVVNFPVE	DEALGGTAFV	QMPAHGLFPW	CGLLLDTRTL	EVQSDYSSYA	950
RTSIRASLTF	NRGFKAGRNM	RRKLFGVLRL	KCHSLFLDLQ	VNSLQTVCTN	1000
IYKILLLQAY	RFHACVLQLP	FHQQVWKNPT	FFLRVISDTA	SLCYSILKAK	1050
NAGMSLGAKG	AAGPLPSEAV	QWLCHQAFLL	KLTRHRVTYV	PLLGSLRTAQ	1100
TOLSRKLPGT	TLTALEAAAN	PALPSDFKTI	LD		1132



○·· ▼		יילטיין אין דיין ייליין יילייין יילייין יילייין ייליין ייליין ייליין ייליין ייליין ייליין ייליין ייליין ייל	D103 DBO I IDKKITEBDIMIENKKIVNSORKITKI ITNIKI I NSHI MI KII			620 630 640 650	(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123	PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length
P123.PRO LIPKKTTFRPIMTFNKKIVNSDRKTTKLTTNIKLLNSHLMLKTL	P123 PRO 11PKKTTFRP1MTFNKKIVNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTL	D103 DBC ! IDKKITEBD!MIFNKKIVNSORKITK! TINIK! INSH! MIKI		VVGARTF	≠90 ≠100 ≠120 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA • ipk • rpi m • • • • • • • • • • • • • • • • • •	PHTC.PRO KFLHWLMSYYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIRÖHLKRVOLRDYSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.::I.LK: L:V E EV :::.:LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10 *20 *40 *50 *60 F100 *100 *100 *100 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	#50 #70 OHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALL ::LK: L :V E EV ::: :: ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFA #50 #70	(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 \$\frac{4}{10}\$ \$\frac{4}{2}0\$ \$\frac{4}{9}0\$ \$\frac{4}{6}0\$ \$\frac{6}{7}0\$ \$\frac{6}{8}0\$ PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W. : ::I ::LK: L :V E EV ::: ::RR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W. : ::I ::LK: L :V E EV ::: ::RR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W. : ::I ::LK: L :V E EV ::: ::RR F123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN:IWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{4}{9}0\$ \$\frac{4}0\$ \$\frac{4}{9}0\$ \$\frac{4}{9}0\$ \$\frac{4}{9}0\$ \$\frac{4}{9}0\$ \$\
NKKIVNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLML	P123 PRO I IPKKTTERPI MTF NKKI VNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTL	DIOS DED I IDENTITEDEI MIE NKKIVNSORKITKI TINIKI I NSHI MIKII		PHIC. PRO FIPKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLISRVKALFSVLNYERA	≠90 ≠100 ≠120 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	PHTC.PRO KFLHWLMSYYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIRÖHLKRVOLRDYSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.::I.LK:L:V E EV :::.:LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 410 400 400 410 410 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.:.:I.K: L:V E EV:::.::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR P123.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 \$\frac{\psi_0}{\psi_0} \frac{\psi_0}{\psi_0} \frac{\psi_0}
:IPK:RPI M.::LT:K L S L P123.PRO LIPKKTTFRPIMTFNKKIVNSORKTTKLTTNIKLLNSHLMLĶTL	:IPK ::RPI M.: .:.::LT:K L S L P123 PRO I IPKKTTFRPIMFFNKKIVNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTL	IPK .:RPI M.: . :LT:K L S L	:IPK:RPI M.:LT:KLSL		¢90 ¢100 ¢120	PHTC.PRO KFLHWLMSYYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIRÖHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.:.:I.K: L:V E EV :::.::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN:IWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10 *20 *40 *50 *60 *70 *90 *100 *110 *120	PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W.:.::I.:LK: L:V E EV :::::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$10 \$20 \$40 \$110 \$120	(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$0 \$\frac{\pi}{\pi}\$0 \$\frac{\pi}{\pi}\$0 \$\frac{\pi}{\pi}\$0 \$\frac{\pi}{\pi}\$0 \$\frac{\pi}{\pi}\$0 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR \$\ki.L.W.: VV.L.R.FFYVTE :::YRK::W.:::I.K: L:V E EV :::::LR \$\ki.L.W.: VV.L.R.FFYVTEQQKSYSKTYYYRKN:IWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{\pi}{\pi}\$0 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$20 \$\frac{\pi}{\pi}\$0 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$10 \$\frac{\pi}{\pi}\$120
PHIL.PRU FIPRPUGLRPIVNMUTVVGARIFRRERLISKVRALFSVLNTERA :IPK .:RPI M.:LT:K L S L P123.PRO LIPKKTTFRPIMTFNKKIVNSORKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTL	PHIC.PRO FIPAPOGLAPIVNMOTVYGARIFAREARLISAVAALFSYLNTERA IPK .:RPI M.:LT:K L S L P123 PRO IIPKKTIFRPIMTFNKKIVNSDRKTIKLTINIKLLNSHLMLKTL	PHIC.PRU FIPKPUGLRPIVNMUTVVGARIFRRENRAERLIJRVRALFJYLNTERA IPKRPI MLTLTK L S L D103 DDO 1 DVRITERDIMTFNKKIVNSORKITKI TINIKI I NSHI MI KII	PHIC.PRU FIPRPUGLAPIVNMUTVVGARIFARENAERLISKVAALFSVLNTERA :IPK .::RPI M.::LT:K L S L		₹100 ₹110	PHTC.PRO KFLHWLMSYYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIRÖHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{1}{2}0\$ \$\frac{1}{4}0\$ \$\frac{1}{4}0	#20 #30 #40 #50 #60 #70 #80 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W.:.:I.:LK: L:V E EV:::::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR #10 #30 #40 #50 #60 #70	(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 \$\frac{40}{6}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{6}\$ \frac{6}{70}\$ \frac{6}{6}\$
						PHIC.PRO KFLHWLMSYYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. :::I ::LK: L :V E EV :::. :::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR	PHIC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W.:.::I ::LK: L:V E EV :::. :::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN:IWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR	(1>17) 31.5 4 6 123 \$\varphi\$10 \$\varphi\$20 \$\varphi\$30 \$\varphi\$40 \$\varphi\$50 \$\varphi\$60 \$\varphi\$70 \$\varphi\$80 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE 1::YRK::W.:.i.TK: L:V E EV :::.::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR
*10 *20 *40 *50 *60 *70 *90 *110 *120 PHTC.PRO FIPKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK:RPI M.: .::.LT:K L S L	*10 *20 *40 *50 *60 *70 *90 *110 *120 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK:RPI M.::.:LT:K L S L	*10 *20 *40 *50 *60 *70 *90 *110 *120 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK .:RPI M.: .::LT:K L S L	*10 *20 *40 *50 *60 *70 *90 *110 *120 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK:RPI M.: .:::LT:K L S L	⁴ 10 ⁴ 20 ⁴ 30 ⁴ 40 ⁴ 50 ⁴ 60 ⁴ 70	&10 &20 &20 &410 &E0 &E70	PHIC.PRO KFLHWLMSYYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIRÖHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. : ::I .:LK: L :V E EV ::: :: ::LR	#30 #50 #50 #50 #50 #40 #50 #60 #70 #60 #70 #80 #80 #70 #80 #80 #10 #70 #80 #70 #80 #70 #80 #70 #80 #70 #80 #70 #80 #80 #80 #80 #80 #80 #80 #80 #80 #8	(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 \$\visin\$10 \$\visin\$20 \$\visin\$30 \$\visin\$40 \$\visin\$50 \$\visin\$60 \$\visin\$70 \$\visin\$80 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W. :::I ::LK: L :V E EV :::. :::LR
P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{4}{10}\$ \frac{4}{2}O\$ \frac{4}{3}O\$ \frac{4}{4}O\$ \frac{4}{5}O\$ \frac{4}{6}O\$ \frac{4}{5}O\$ \frac{4}	P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 410 420 430 440 400 400 400 400 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK .:RPI M.: .:LT:K L S L	P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{4}{10}\$\$ \text{*20}\$\$ \text{*30}\$\$ \text{*40}\$\$ \$\frac{4}{5}0\$\$\$ \text{*60}\$\$ \text{*70}\$\$ PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVGARTFREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK .:RPI M.: .:LT:K L S L	P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 410 420 430 440 590 5100 5100 5120 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK .:RPI M.: .::LT:K L S L	P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKN:IWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10 *20 *70	P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 10 40 40 40 40 40 40 40 40 40 40 40 40 40	PHTC. PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR	\$10 \$70 \$80 \$80 \$80 \$80 \$80 \$80 \$80 \$80 \$80 \$8	2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 \$\visin\$10 \(\visin\$20 \(\visin\$40 \\\visin\$50 \(\visin\$60 \\\visin\$80 PHTC. PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR
K:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10 *20 *30 *40 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK:RPI M.: .:LT:K L S L P123.PRO LIPKKTTFRPIMTFNKKIVNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTL	K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W. : ::I .:LK: L :V E EV ::: ::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 410 420 430 440 450 450 470 PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK .:RPI M.: .::LT:K L S L	K:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 410 420 430 440 PHTC.PRO FIPKPOGLRPIVNMDYVVGARTFREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA IPK:RPI M.::.LT:K L S L PHTC.PRO FIPKPOGLRPIV-MTFNKKIVNSORKTTKITTNTKIINSHIMIKTI	K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.:.:I.LK: L:V E EV :::. ::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKN!WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR &10 &20 &40 &50 &50 F90 &110 &120 PHTC.PRO FIPKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W. : .::I .:LK: L :V E EV ::: :: .:LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKN:IWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR &10 &20 &40	K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. : .::I .:LK: L :V E EV ::: :: .::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR &10 &20 &410	COT	\$10 \$20 \$40 \$50 \$50 \$80	(2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 \$\epsilon \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \tilde{\pi} \q
PHIC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVIE :::YRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLKDVSEAEVROHREARPALLISRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVIE :::YRK::W. : .::I .:LK: L :V E EV :::::LR K:L:W: VV.L:R.FFYVIE .::YRK::W. : .::I .:LK: L :V E EV .::::LR PI23.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10	PHIC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVIE :::YRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLKDVSEAEVROHREARPALLISRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVIE :::YRK::W. : .::I .:LK: L :V E EV ::: . ::LR F123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR &10 &20 &40 F100 &700 F100 &710 &710 F100 &710 &710 F100 F1PKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK .:RPI M.: .:.:::LT:K L S L F123.PRO I IPKKITFRPIMIFNKKIVNSDRKITKLINJKLLNSHLMLKTL	PHIC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVIEIIFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLISRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVIE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10 *20 *40 *50 *60 F100 *100 PHIC.PRO FIPKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK .:RPI M.: .:LT:K L S L	PHIC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVIEIIFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLISRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVIE ::::YRK::W. : .::I .:LK: L :V E EV :::. :::LR K:L:W: VV.L:R.FFYVIE	PHIC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVIEIIFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLISRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. : .::I .:LK: L :V E EV ::: :: .:.LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN!WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR &10 &20 &40	PHIC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVIEIIFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLISRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. ::::I .:LK: L :V E EV :::. :::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR		50 s 00 s	(1>117) 31.5 4 6 123
PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>17) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRYOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE F123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYTRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR A10 A20 A40 A40 A50 PHTC.PRO FIPKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA : IPK ::RPI M: ::::::LT::K L S L P123.PRO LIPKKTTFRPIMTF-NKKIVNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTL	PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. :::I.LK: L:V E EV ::::I.R P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN:WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR LOO LOO LOO LOO LOO LOO LOO LOO LOO LO	PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 FIGURE FOR KELHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE K:L:W: VV.L:R.FFYVTE FIZ3.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR LOO FIO FIO FIDE FOR FILE	PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 FIG. \$\frac{4}{2}O\$ \$\frac{4}{3}O\$ \$\frac{4}{4}O\$ \$\frac{6}{5}O\$ \$\frac{6}{6}O\$ \$\frac{7}{7}O\$ \$\frac{6}{8}O\$ PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{4}{1}O\$ \$\frac{4}{2}O\$ \$\frac{4}{3}O\$ \$\frac{4}{4}O\$ \$\frac{4}{5}O\$ \$\frac{4}{6}O\$ \$\frac{4}{5}O\$	PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length Length (1>117) 31.5 4 6 123 (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W:. VV.L:R:FFYVTE R:L:W:. VV.L:R:FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR	PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length Length (1>117) 31.5 4 6 123 (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR	P123.PRO Index Number Length Ler (1>117) 31.5 4 6	P123.PRO Index Number Length	
Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length Length (2>124) (1>17) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE K:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{4}{2}0\$ \$\frac{4}{2}0\$ \$\frac{4}{2}0\$ \$\frac{4}{2}0\$ PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK ::RPI M:::::::LT::K L S L P123.PRO LIPKKTTFRPIMTFNKKIVNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTL	Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W.:.::I.:LK: L:V EV:::.:::	Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 F10 F20 F30 F40 F50 F60 F70 F80 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W:IIIIK L:V EV:::::IR F123.PRO KLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR F10 F20 F10 F10 F120 F90 F10 F10 F120 F90 F10 F11 VARIANERSKALFSVKALFSVLNYERA SPHIC.PRO F1PKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA SPHIC.PRO F1PKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA SPHIC.PRO F1PKPOGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA	Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE R:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{4}{10}\$ \$\frac{4}{20}\$ \$\frac{4}{30}\$ \$\frac{4}{40}\$ \$\frac{4}{50}\$ \$\frac{4}{60}\$ \$\frac{4}{7}0\$ PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERA :IPK ::RPI M: ::.::LT:K L S L	Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.:.:I.:LK: L:V EV:::::LR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.:.:I.:LK: L:V EV:::::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN:WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10	Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE R:L:W:. VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR	3) Seq2(1>150) Similarity Gap Consen P123.PRO Index Number Length Ler (1>117) 31.5 4 6	3) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Con P123.PRO Index Number Length	Seq2(1>150) Similarity Gap
Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRYOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K.L.W. VV.L.R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR *10	Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length Length \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 124) \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 124) \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQUKSYSKTYYYRKNI-WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{\pi}{\pi}\$ 10 \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123 \$\triangle{\pi}\$ PHTC.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFREKRAERLISRVKALFSVLNYERA \$\frac{\pi}{\pi}\$ 123.PRO IPKKTTFRPIMKIVNNDDKKTTKLTNTKLLNSHLMI-KTL	Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRYOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W : ::I ::LK: L : V E V ::: :::RR K:L:W:. VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W : ::I ::LK: L : V E V ::: :::RR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 4:10	Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KELHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I.LK: L:V E V:::::LR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN:WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR \$\frac{4}{2}0\$ \$	Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC. PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R:FFYVTE K:L:W: VV.L:R:FFYVTE F123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEORSYSKTYYYRKN:WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR A10 A20 A30 A40 A50 A50 A50 A50 A50 A50 A50 A50	Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC. PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE K:L:W: VV.L:R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKN:WDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR	sap Gap Consen ber Length Ler 4 6	sap Gap Con ber Length)ap
Lipman-Pearson Protein Alignment (tuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KELHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRYOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K.L.W. VV.L.R.FFYVTE K.L.W. VV.L.R.FFYVTE P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR P123.PRO KLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR P123.PRO FIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLISRVKALFSVLNYERA SPO F100 F110 F110 F120 P123.PRO LIPKKTIFRPI M.:	Lipman-Pearson Protein Alignment (tuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (1>17) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KELHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRYOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K.L.W.: VV.L.R.FFYVTE : ::YRK::W.::I.LK: L:V EV ::: ::LR K.L.W.: VV.L.R.FFYVTE : ::YRK::W.::I.LK: L:V EV ::: ::	Lipman-Pearson Protein Alignment (tuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (1>17) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KELHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRYOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :: :YRK::W : :: i :LK: L : V E V ::: :: :. :RR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :: :YRK::W : :: i :LK: L : V E V ::: :: :. :RR P123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 4:10	Lipman-Pearson Protein Alignment (tuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO P123.PRO F20 F30 F40 F50 F60 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLROVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I.K: L :V E V ::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I.K: L :V E V ::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I.K: L :V E V ::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I.K: L :V E V ::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I.K: L :V E V ::: F123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEORKSYSTTYYRKNIMDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR F90 F100 F110 F110 F110 F110 F110 F90 F110 F110 F110 F110 F110 F110 F110 F	Lipman-Pearson Protein Alignment Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length PHTC.PRO FLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. :::I ::LK: L :V E EV ::::::LR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. :::I ::LK: L :V E EV ::::::LR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. :::I ::LR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W. :::I ::LR F123.PRO KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR 410	Lipman-Pearson Protein Alignment Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length PHTC.PRO P123.PRO #20 #30 #40 #50 #60 #70 #80 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I ::LK: L:V E EV :::::LR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I ::LK: L:V E EV :::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I ::LK: L:V E EV :::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I ::LK: L:V E EV :::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W :::I ::LK: L:V E EV :::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::YRK::W :::I ::LK: L:V E EV :::: K:L:W: VV.L:R.FFYVTE ::::RADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGKLR	sap Gap Consen ber Length Ler 4 6	sap Gap Con ber Length)ap
Lipman-Pearson Protein Alignment Ktuple: 2: Gap Penalty: 4: Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>129) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus PHTC.PRO P123.PRO Index Number Length Length (2>124) (1>117) 31.5 4 6 123 PHTC.PRO KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFORNRLFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSRLR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W::R.F.Y. L.V E V:::R.F.Y. L.Y. R.F.Y. R. R.F.Y. R.F.Y. R. R.F.Y. R. R.F.Y. R.F	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus D P123.PRO Index Number Length Length (1>17) 31.5 4 6 123 FILMLMSYYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSR K:L:W: VV.L.R.FFFYVTE :::YRK::W. :::I.LK: L:V EV :::: KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOOKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGK LOO FIO FIO FIO FIO FIO FIO FIO FIO FIO F	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus D P123.PRO Index Number Length Length (1>17) 31.5 4 6 123 KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE K:L:W: VV.L:R.FFY	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus D P123.PRO Index Number Length Length (1>117) 31.5 4 6 123 KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE :::YRK::W.:.:I.:LK: L:V EV:::::: KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEORKSYSKTYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGK LOO FIO FIO FIO FIO FIO FIO FIO FIO FIO F	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Gap Consensus Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus 19) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus (1>117) 31.5 4 6 123 KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSR K:L:W:VV.L:R.FFYVTE K:L:W:VV.L:R.FFYVTE KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEOQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVOEKEV-EEWKKSLGFAPGK A10 A20 A30 A40 A50 A50 A50 A50	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consensus D P123.PRO Index Number Length Length (1>117) 31.5 4 6 123 KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFOKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIROHLKRVOLRDVSEAEVROHREARPALLTSR K:L:W: VV.L:R.FFYVTE K:L:RW:REDLVVSLIRCFFYVTE K:R:RW:REDLVVSLIRCFFYVTE K:RU:RDLVVSLIRCFFYVTE K:RU	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 (9) Seq2(1>150) Similarity Gap Gap Consen D123.PRO Index Number Length Ler	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 !9) Seq2(1>150) Similarity Gap Con O P123.PRO Index Number Length	arson Protein Alignment Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 !9) Seq2(1>150) Similarity Gap

- 4/15-

	n	
	Ö	1
)		
	1	

)							
Lipman-Pear	Lipman-Pearson Protein Alignment		, ,				
Ktuple: 2; 58 Seq1(1>150)	Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12 Seq1(1>150) Seq2(1>150) Similarity G	engtn Penalty: 12 Similarity Gap	ly: 1.2 Gap	Gap Cc	Gap Consensus		
P123.PRO		Index	Index Number	Length	Length		
(2>148)	(1>146)	21.6	4	5	149		
	¥10	£ 20	4 30	01/2	4 50	¢60 ¢70	₹80
P123.PR0	LLRWIFEDLVVSLIR	CFFYVTEOO	KSYSKTYYY	'RKN I WDV I M	KMSIADLKKETL	LLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSIADLKKETLAEVOEKEVEEWKKSLGFAPGKLRLIP	.RL I P
	::	FFY TE	 	RW.	. I.: K. L	. Н	R: 1P
EST2P.PRO	F I SWLFROL I PK I 10	TFFYCTE1S	STVTIVYF-	RHDTWNKLI	TPFIVEYFKTYL	/ENNVCRNHNSYTLS	1R I I P
	√ 10	4 20	√ 30	Oh₃	0 +50	6 00 ₹ 70	
	06\$	€ 100	, , 110	10	₹120 ₹ 130	₹140	
P123.PR0	KKTTFRPIMTFNK	K I VNSDRKT	TKLTTNTKL	LNSHLMLKT	LKNRMFKDPFGF	KKTTFRPIMTFNKKIVNSDRKTTKLTTNTKLLNSHLMLKTLKNRMFKDPFGFAVFNYDDVMKKYEEFVC	
	KK: .FR 1	:	 	.: ::	L:N: .:F.	母	
EST2P.PRO	KK SNNEFRI I A I PCR	GADEEEFTI	YKENHKNA	IOPTOKILĘY	LRNKR-PTSFT-	YSPTO	
	680 ♣90	√ 100	√ 110	10	₹ 120 ₹ 130	0 4140	

9	
Ö	
•	
_	

Lipman-Pearson Protein Alignment Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Le Seq1(1>129) Seq2(1>150) PHTC.PRO EST2P.PRO (3>85) (1>80) F: WL. EST2P.PRO FLHWLMSVYVVELLRS F: WL. F: W		Length Penalty: 12 Similarity G Index Num 23.3 \$\frac{\epsilon}{23.3} \$\fra	ilarity Gap lindex Number 23.3 3 Contact Signature of the second of th	Gap Gap Consens 3 3 3 430	Gap Consensus 3 83 440 W.KL : I ::K W.KL	Length Penalty: 12) Similarity Gap Consensus) Similarity Gap Consensus 23.3 3 83 \$\frac{\psi 0}{\psi 0} \psi 0
	480 490	NGAULLER A1($\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	110 UN.	1 LE I LRIN 4 120	

F19. 7

Alignment Workspace of Untitled, using Clustal method with PAM250 residue weight table

	1 1	KFLXWLFXXLVVXLIRXFFYVTEXXXXXXXXYYRKXXWXKLXXXXIXXXLKXXXLXXVXEXEVRXHXXXXLX - FXXS 10 20 30 40 50 60 70 8	XXXXXXXX	RKXXWXKL.X 40	E E E E E E E E E E E E E E E E E E E	SXIXXVXEXE 60	SVRXHXXXXLX-	FXXS 80
PHIC.PRO	AKFLHWLMSVYV	PHIC.PRO AKFLHWLMSVIVVELLKSFFIVIETIFQKNRLFFIRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRDVSEAEVRQHREARPA-LLIS	I'YKNKLIFY	RKSVWSKLQ	SIGIRQHLKI	KVQLRDVSEAF	EVROHREARPA -	LLTS
P123.PRO	-KLLRWIFEDLV	P123.PRO -KLLRWIFEDLVVSLIRCFFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIWDVIMKMSI-ADLKKETLAEVQEKEV-EEWKKSLG-FAPG	QKSYSKTYYY	RKNIWDVIM	KMSI-ADLKI	KETLAEVQEKU	EV - EEWKKSLG -	FAPG
EST2P.PRO	FISWLFRQLI	EST2P.PROFISWLFRQLIPKIIQTFFYCTEIS-STVTIVYFRHDTWNKLITPFIVEYFKTYLVENNVCRNHNSYTLSNFNHS	S-STVTIVYF	RHDTWNKLI	TPFIVEYFKI	FYL VENIN	VCRNHNSYTLSN	FNHS

-TXXXEXXXXXITXXXXXXIX---XLXXXXXXXXXXXXX--FSVXNYXDXXXXXX LRLIPKKTT--FRPIMTFN----KK---IVNSDRKTTKLITNTKLLLNSHLMLKTLKNRMFKDPFGFAVFNYDDVMKKYE EST2P.PRO MRIIPKKSNNEFR-IIAIPCRGADEEFTIYKENHKNAIQPTQKILE---YLRNKRPTSFTKI--YSPTQIADRIKEFK LRFIPKPDG--LRPIVNMDYVVGAR---TFRREKRAERLTSRVKAL-----------FSVLNYERA R SEES B R LIRXI PKKXX -- FRPIXXXXXXXXXXXX --P123.PRO PHTC. PRO

WO 98/59040 PCT/EP98/03468

F	ia.	8			-	8	'	15	-

GTGCCTGCAG	AGACCCGTCT	GGTGCACTCT	GATTCTCCAC	TTGCCTGTTG	CATGTCCTCG	TTCCCTTGTT	70
TCTCACCACC	TCTTGGGTTG	CCATGTGCGT	TTCCTGCCGA	GTGTGTGTTG	ATCCTCTCGT	TGCCTCCTGG	140
TCACTGGGCA	TTTGCTTTTA	TTTCTCTTTG	CTTAGTGTTA	CCCCCTGATC	TTTTTATTGT	CGTTGTTTGC	210
TTTTGTTTAT	TGAGACAGTC	TCACTCTGTC	ACCCAGGCTG	GAGTGTAATG	GCACAATCTC	GGCTCACTGC	280
AACCTCTGCC	TCCTCGGTTC	AAGCAGTTCT	CATTCCTCAA	CCTCATGAGT	AGCTGGGATT	ACAGGCGCCC	350
ACCACCACGC	CTGGCTAATT	TTTGTATTTT	TAGTAGAGAT	AGGCTTTCAC	CATGTTGGCC	AGGCTGGTCT	420
CAAACTCCTG	ACCTCAAGTG	ATCTGCCCGC	CTTGGCCTCC	CACAGTGCTG	GGATTACAGG	TGCAAGCCAC	490
CGTGCCCGGC	ATACCTTGAT	CTTTTAAAAT	GAAGTCTGAA	ACATTGCTAC	CCTTGTCCTG	AGCAATAAGA	560
CCCTTAGTGT	ATTTTAGCTC	TGGCCACCCC	CCAGCCTGTG	TGCTGTTTTC	CCTGCTGACT	TAGTTCTATC	630
TCAGGCATCT	TGACACCCCC	ACAAGCTAAG	CATTATTAAT	ATTGTTTTCC	GTGTTGAGTG	TTTCTTTAGC	700
TTTGCCCCCG	CCCTGCTTTT	CCTCCTTTGT	TCCCCGTCTG	TCTTCTGTCT	CAGGCCCGCC	GTCTGGGGTC	770
CCCTTCCTTG	TCCTTTGCGT	GGTTCTTCTG	TCTTGTTATT	GCTGGTAAAC	CCCAGCTTTA	CCTGTGCTGG	840
CCTCCATGGC	ATCTAGCGAC	GTCCGGGGAC	CTCTGCTTAT	GATGCACAGA	TGAAGATGTG	GAGACTCACG	910
AGGAGGGCGG	TCATCTTGGC	CCGTGAGTGT	CTGGAGCACC	ACGTGGCCAG	CGTTCCTTAG	CCAGGGTTGG	980
CTGTGTTCCG	GCCGCAGAGC	ACCGTCTGCG	TGAGGAGATC	CTGGCCAAGT	TCCTGCACTG	GCTGATGAGT	1050
GTGTACGTCG	TCGAGCTGCT	CAGGTCTTTC	TTTTATGTCA	CGGAGACCAC	GTTTCAAAAG	AACAGGCTCT	1120
TTTTCTACCG	GAAGAGTGTC	TGGAGCAAGT	TGC				1153

Fig.9

CAGAGCCCTG	GTCCTCCTGT	CTCCATCGTC	ACGTGGGCAC	ACGTGGCTTT	TCGCTCAGGA	CGTCGAGTGG	70
ACACGGTGAT	CTCTGCCTCT	GCTCTCCCTC	CTGTCCAGTT	TGCATAAACT	TACGAGGTTC	ACCTTCACGT	140
TTTGATGGAC	ACGCGGTTTC	CAGGCACCGA	GGCCAGAGCA	GTGAACAGAG	GAGGCTGGGC	GCGGCAGTGG	210
AGCCGGGTTG	CCGGCAATGG	GGAGAAGTGT	CTGGAAGCAC	AGACGCTCTG	GCGAGGGTGC	CTGCAGAGAC	280
CCGCCTGGTG	CACTCTGATT	CTCCACTTGC	CTGTTGCATG	TCCTCGTTCC	CTTGTTTCTC	ACCACCTCTT	350
GGGTTGCCAT	GTGCGTTTCC	TGCCGAGTGT	התקדוה אדרר ז	ירדרקידקרר ז	יררדי בידר אר די	3	412

Fig.10

GGGGTCCTGG	GCCCACCCGG	GCAGGACGCG	TGGACCGAGT	GACCGTGGTT	TCTGTGTGGT	GTCACCTGCC	70
AGACCCGCCG	AAGAAGCCAC	CTCTTTGGAG	GGTGCGCTCT	CTGGCACGCG	CCACTCCCAC	CCATCCGTGG	140
GCCGCCAGCA	CCACGCGGG	CCCCCATCCA	CATCGCGGCC	ACCACGTCCC	TGGGACACGC	CTTGTCCCCC	210
GGTGTACGCC	GAGACCAAGO	ACTTCCTCTA	CTCCTCAGGC	GACAAGGAGC	AGCTGCGGcC	CTCCTTCCTA	280
CTCAGCTCTC	TGAGGCCCAG	CCTGACTGGC	GCTCGGAGGC	TCGTGGAGAC	CATCTTTCTG	GGTTCCAGGC	350
CCTGGATGCC	AGGGACTCCC	CGCAGGTTGC	CCCGCCTGCC	CCAGCGCTAC	TGGCAAATGC	GGCCCCTGTT	420
TCTGGAGCTG	CTTGGGAACC	ACGCGCAGTG	CCCCTACGGG	GTGCTCCTCA	AGACGCACTG	CCCGCTGCGA	490
GCTGCGGTCA	CCCCAGCAGC	CGGTGTCTGT	GCCCGGGAGA	AGCCCCAGGG	CTCTGTGGCG	GCCCCCGAGG	560
AGGAGGACAC	AGACCCCCGT	CGCCTGGTGC	AGCTGCTCCG	CCAGCACAGC	AGCCCCTGGC	AGGTGTACGG	630
CTTCGTGCGG	GCCTGCCTGC	GCCGGCTGGT	GCCCCCAGGC	CTCTGGGGCT	CCAGGCACAA	CGAACGCCGC	700
TTCCTCAGGA	ACACCAAGAA	GTTCATCTCC	CTGGGGAAGC	ATGCCAAGCT	CTCGCTGCAG	GAGCTGACGT	770
GGAAGATGAG	CGTGCGGGAC	TGCGCTTGGC	TGCGCAGGAG	CCCAGGTGAG	GAGGTGGTGG	CCGTCGAGGG	840
CCCAGGCCCC	AGAGCTGAAT	GCAGTAGGGG	CTCAGAAAAG	GGGGCAGGCA	GAGCCCTGGT	CCTCCTGTCT	910
CCATCGTCAC	GTGGGCACAC	GTGGCTTTTC	GCTCAGGACG	TCGAGTGGAC	ACGGTGATCT	CTGCCTCTGC	980
TCTCCCTCCT	GTCCAGTTTG	CATAAACTTA (CG C				1012

Fig. 11

GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GTTTCAGGCA GCGCTGCGTC CTGCTGCGCA CGTGGGAAGC CCTGGCCCCG 70 GCCACCCCG CGATGCCGCG CGCTCCCCGC TGCCGAGCCG TGCGCTCCCT GCTGCGCAGC CACTACCGCG 140 AGGTGCTGCC GCTGGCCACG TTCGTGCGGC GCCTGGGGCC CCAGGGCTGG CGGCTGGTGC AGCGCGGGGA 210 CCCGGCGGCT TTCCGCGCGC TGGTGGCCCA GTGCCTGGTG TGCGTGCCCT GGGACGCACG GCCGCCCCC 280 GCCGCCCCT CCTTCCGCCA GGTGTCCTGC CTGAAGGAGC TGGTGGCCCG AGTGCTGCAG AGGCTGTGCG 350 AGCGCGGGGG GAAGAACGTG CTGGCCTTCG GCTTCGCGCT GCTGGACGGG GCCCCGCGGGG GCCCCCCCGA 420 GGCCTTCACC ACCAGCGTGC GCAGCTACCT GCCCAACACG GTGACCGACG CACTGCGGGG GAGCGGGGCG 490 TGGGGGCTGC TGCTGCGCCG CGTGGGCGAC GACGTGCTGG TTCACCTGCT GGCACGCTGC GCGCTCTTTG 560 TGCTGGTGGC TCCCAGCTGC GCCTACCAGG TGTGCGGGCC GCCGCTGTAC CAGCTCGGCG CTGCCACTCA 630 GGCCCGGCCC CCGCCACACG CTAGTGGACC CCGAAGGCGT CTGGGATGCG AACGGGCCTG GAACCATAGC 700 GTCAGGAGG CCGGGGTCCC CCTGGGCCTG CCAGCCCCGG GTGCGAGGAG GCGCGGGGC AGTGCCAGCC 770 GAAGTCTGCC GTTGCCCAAG AGGCCCAGGC GTGGCGCTGC CCCTGAGCCG GAGCGGACGC CCGTTGGGCA 840 GGGGTCCTGG GCCCACCCGG GCAGGACGCG TGGACCGAGT GACCGTGGTT TCTGTGTGGT GTCACCTGCC 910 AGACCCGCCG AAGAAGCCAC CTCTTTGGAG GGTGCGCTCT CTGGCACGCG CCACTCCCAC CCATCCGTGG 980 GCCGCCAGCA CCACGCGGGC CCCCCATCCA CATCGCGGCC ACCACGTCCC TGGGACACGC CTTGTCCCCC 1050 GGTGTACGCC GAGACCAAGC ACTTCCTCTA CTCCTCAGGC GACAAGGAGC AGCTGCGGCC CTCCTTCCTA 1120 CTCAGCTCTC TGAGGCCCAG CCTGACTGGC GCTCGGAGGC TCGTGGAGAC CATCTTTCTG GGTTCCAGGC 1190 CCTGGATGCC AGGGACTCCC CGCAGGTTGC CCCGCCTGCC CCAGCGCTAC TGGCAAATGC GGCCCCTGTT 1260 TCTGGAGCTG CTTGGGAACC ACGCGCAGTG CCCCTACGGG GTGCTCCTCA AGACGCACTG CCCGCTGCGA 1330 GCTGCGGTCA CCCCAGCAGC CGGTGTCTGT GCCCGGGAGA AGCCCCAGGG CTCTGTGGCG GCCCCGAGG 1400 AGGAGGACAC AGACCCCCGT CGCCTGGTGC AGCTGCTCCG CCAGCACAGC AGCCCCTGGC AGGTGTACGG 1470 CTTCGTGCGG GCCTGCTGC GCCGGCTGGT GCCCCCAGGC CTCTGGGGGCT CCAGGCACAA CGAACGCCGC 1540 TTCCTCAGGA ACACCAAGAA GTTCATCTCC CTGGGGAAGC ATGCCAAGCT CTCGCTGCAG GAGCTGACGT 1610 GGAAGATGAG CGTGCGGGAC TGCGCTTGGC TGCGCAGGAG CCCAGGTGAG GAGGTGGTGG CCGTCGAGGG 1680 CCCAGGCCCC AGAGCTGAAT GCAGTAGGGG CTCAGAAAAG GGGGCAGGCA GAGCCCTGGT CCTCCTGTCT 1750 CCATCGTCAC GTGGGCACAC GTGGCTTTTC GCTCAGGACG TCGAGTGGAC ACGGTGATCT CTGCCTCTGC 1820 TCTCCCTCCT GTCCAGTTTG CATAAACTTA CGAGGTTCAC CTTCACGTTT TGATGGACAC GCGGTTTCCA 1890 GGCGCCGAGG CCAGAGCAGT GAACAGAGGA GGCTGGGCGC GGCAGTGGAG CCGGGTTGCC GGCAATGGGG 1960 AGAAGTGTCT GGAAGCACAG ACGCTCTGGC GAGGGTGCCT GCAGGGGTTG GCTGTGTTCC GGCCGCAGAG 2030 CACCGTCTGC GTGAGGAGAT CCTGGCCAAG TTCCTGCACT GGCTGATGAG TGTGTACGTC GTCGAGCTGC 2100 TCAGGTCTTT CTTTTATGTC ACGGAGACCA CGTTTCAAAA GAACAGGCTC TTTTTCTACC GGAAGAGTGT 2170 CTGGAGCAAG TTGCAAAGCA TTGGAATCAG ACAGCACTTG AAGAGGGTGC AGCTGCGGGA GCTGTCGGAA 2240 GCAGAGGTCA GGCAGCATCG GGAAGCCAGG CCCGCCCTGC TGACGTCCAG ACTCCGCTTC ATCCCCAAGC 2310 CTGACGGGCT GCGGCCGATT GTGAACATGG ACTACGTCGT GGGAGCCAGA ACGTTCCGCA GAGAAAAGAG 2380 GGTGGCTGTG CTTTGGTTTA ACTTCCTTTT TAAACAGAAG TGCGTTTGAG CCCCACATTT GGTATCAGCT 2450 TAGATGAAGG GCCCGGAGGA GGGGCCACGG GACACAGCCA GGGCCATGGC ACGGCGCCAA CCCATTTGTG 2520 CGCACGGTGA GGTGGCCGAG GTGCCGGTGC CTCCAGAAAA GCAGCGTGGG GGTGTAGGGG GAGCTCCTGG 2590 GGCAGGGACA GGCTCTGAGG ACCACAAGAA GCAGCTGGGC CAGGGCCTGG ATGCAGCACG GCCCGAGCGG 2660 GTGGGGGCCC ACCACGCCAT TCTGGTCAAA GGTGTTGTAG TCGTAATAGC CGGCCCAGGC GCTCTGAACC 2730 TTCAGAGTCT CAAAAGCTGG GACCCTCAGG GCCAAATGGG GCCACACCTT GTCCTGGAAG AAATCATGGT 2800 CCACTTCCAG GTTCGCCGGG TCCGGTTCTT CCTGCTCAGT GGGGCTACGA CCACCTAGGT AGTTGCTACC 2870 TAATCCTTCC CGGCGAAAAT AGGCTCCACT GGTGTCTGCA ACAAGCGGAG TCTCTAGGCC TGGTCCCTGG 2940 GGGCAGTGCC ACACATACAC ATACCTTTTC CTCGGCTCCA CAGGTAGCTT GGTGCCCTGC AGGGTGCCAG 3010 GCGGCCCCTC TCCAACACA GCCAGTGCTG CGATTTGCGC AGACCAGGCT CCGGCTGCGT TGATCACAAT 3080 GGCGCATTCC ACAGGCTGGT ACTCCAGGCT GCGGTCCATC TTCACATGGA CTTCATGGAT CCTTTTCAAG 3150 ACCACCGCTT TGTCATCTGT GGTCAACATG CGTTGAGATG AAGAGACAAA ACGTGTCACC TCTCCCTGGC 3220 AGAAAAGGAC TCCCAAGGAC TGGACCTTTC GCCGAAGCCC CTGGAGCAGA CACCAGGGGT CAAACCAACC 3290 TTCGTCCTCC ATCCCATAAG ACGCCAAAGC CACTCCCTCT GTGTTTATCC AGGGAAACTT GTTCCGAAGC 3360 TGATCAGGAG ACATCAGAGA AACTTTGGCT CCCTCCTGCC TCTGCACTTT CACGTTGCTC TCCATGGCTG 3430 CAGCATCCTT TTCTGAAGCC AGCAAGAGGT AGCCCGAGGG GTTGAACCGG AGGTCCAGGG GAGGAGCATC 3500 GACTACGGCC AGGTACTCAT TGATGTTCCG TAGAAAGCTG GCTGAAAAGA GGGAGAGCTG GATGTTCTCA 3570 GGCAATGAGA ACTGCTGACA AATCCCACCT ACTGAGAGCC CAGTGGAGGC CTGTGAATAC GTGTGGTCCC 3640 GTTCCACCAC TAGCACTCGA ATAGCACCTC GTCTGCTCTC CAGCTTCTTC AGCCAATAGG CCACAGACAA 3710 GCCAAGCACC CCACCTCCCA CGATCACCAC ATCCGAGTGC TCGGGAGGCA GGTGGCTGGT GTCTTGCAGT 3780 AGATCACAGG ACCTTCCAGG CAGGATCGAC TTGATCTTCT TCTTAATCTC AGACACCTTT CCATCCCAGT 3850 CCAGAGAAAA GCCTCCTCTG CGCGTGCCTG GCCTCCGGGT CAAGAGGCCC CGGCCCATGC CGTGCGGCAG 3920 AACCCTCCGA ATCATAGCCC CTCTGAGCCC GGGTCGACGC GGCCGCGAAT TC

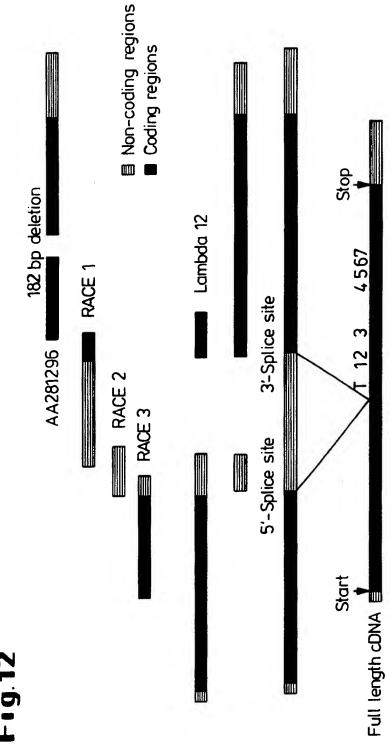


Fig. 13

VVELLRSFFYVTE

hTC

Telomerase motif

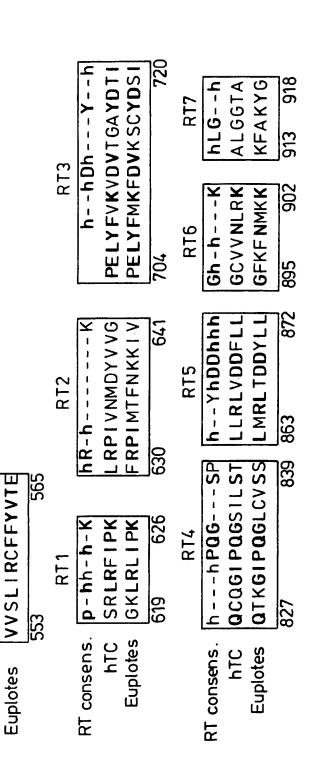
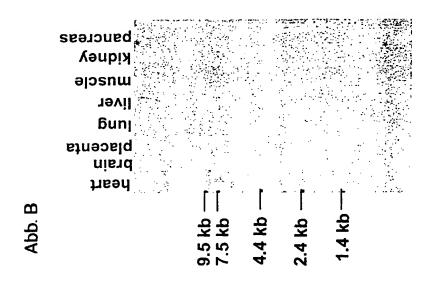


Fig. 14

~							
CCGGAAGAGT	GTCTGGAGCA	AGTTGCAAAG	CATTGGAATC	AGACAGCACT	TGAAGAGGGT	GCAGCTGCGG	1853
GAGCTGTCGG	AAGCAGAGGT	CAGGCAGCAT	CGGGAAGCCA	GGCCCGCCCT	GCTGACGTCC	AGACTCCGCT	1923
TCATCCCCAA	GCCTGACGGG	CTGCGGCCGA	TTGTGAACAT	GGACTACGTC	GTGGGAGCCA	GAACGTTCCG	1993
CAGAGAAAAG	AGGGCCGAGC	GTCTCACCTC	GAGGGTGAAG	GCACTGTTCA	GCGTGCTCAA	CTACGAGCGG	2063
GCGCGGCGCC	CCGGCCTCCT	GGGCGCCTCT	GTGCTGGGCC	TGGACGATAT	CCACAGGGCC	TGGCGCACCT	2133
TCGTGCTGCG	TGTGCGGGCC	CAGGACCCGC	CGCCTGAGCT	GTACTTTGTC	AAGGTGGATG	TGACGGGCGC	2203
GTACGACACC	ATCCCCCAGG	ACAGGCTCAC	GGAGGTCATC	GCCAGCATCA	TCAAACCCCA	GAACACGTAC	2273
TGCGTGCGTC	GGTATGCCGT	GGTCCAGAAG	GCCGCCCATG	GGCACGTCCG	CAAGGCCTTC	AAGAGCCACG	2343
TCTCTACCTT	GACAGACCTC	CAGCCGTACA	TGCGACAGTT	CGTGGCTCAC	CTGCAGGAGA	CCAGCCCGCT	2413
GAGGGGTGCC	GTCGTCATCG	AGCAGAGCTC	CTCCCTGAAT	GAGGCCAGCA	GTGGCCTCTT	CGACGTCTTC	2483
CTACGCTTCA	TGTGCCACCA	CGCCGTGCGC	ATCAGGGGCA	AGTCCTACGT	CCAGTGCCAG	GGGATCCCGC	2553
AGGGCTCCAT	CCTCTCCACG	CTGCTCTGCA	GCCTGTGCTA	CGGCGACATG	GAGAACAAGC	TGTTTGCGGG	2623
GATTCGGCGG	GACGGGCTGC	TCCTGCGTTT	GGTGGATGAT	TTCTTGTTGG	TGACACCTCA	CCTCACCCAC	2693
GCGAAAACCT	TCCTCAGGAC	CCTGGTCCGA	GGTGTCCCTG	AGTATGGCTG	CGTGGTGAAC	TTGCGGAAGA	2763
CAGTGGTGAA	CTTCCCTGTA	GAAGACGAGG	CCCTGGGTGG	CACGGCTTTT	GTTCAGATGC	CGGCCCACGG	2833
CCTATTCCCC	TGGTGCGGCC	TGCTGCTGGA	TACCCGGACC	CTGGAGGTGC	AGAGCGACTA	CTCCAGCTAT	2903
GCCCGGACCT	CCATCAGAGC	CAGTCTCACC	TTCAACCGCG	GCTTCAAGGC	TGGGAGGAAC	ATGCGTCGCA	2973
AACTCTTTGG	GGTCTTGCGG	CTGAAGTGTC	ACAGCCTGTT	TCTGGATTTG	CAGGTGAACA	GCCTCCAGAC	3043
GGTGTGCACC	AACATCTACA	AGATCCTCCT	GCTGCAGGCG	TACAGGTTTC	ACGCATGCGT	GCTGCAGCTC	3113
CCATTTCATC	AGCAAGTTTG	GAAGAACCCC	ACATTTTTCC	TGCGCGTCAT	CTCTGACACG	GCCTCCCTCT	3183
GCTACTCCAT	CCTGAAAGCC	AAGAACGCAG	GTATGTGCAG	GTGCCTGGCC	TCAGTGGCAG	CAGTGCCTGC	3253
CTGCTGGTGT	TAGTGTGTCA	GGAGACTGAG	TGAATCTGGG	CTTAGGAAGT	TCTTACCCCT	TTTCGCATCA	3323
GGAAGTGGTT	TAACCCAACC	ACTGTCAGGC	TCGTCTGCCC	GCCCTCTCGT	GGGGTGAGCA	GAGCACCTGA	3393
TGGAAGGGAC	AGGAGCTGTC	TGGGAGCTGC	CATCCTTCCC	ACCTTGCTCT	GCCTGGGGAA	GCGCTGGGGG	3463
GCCTGGTCTC	TCCTGTTTGC	CCCATGGTGG	GATTTGGGGG	GCCTGGCCTC	TCCTGTTTGC	CCTGTGGTGG	3533
GATTGGGCTG	TCTCCCGTCC	ATGGCACTTA	GGGCCCTTGT	GCAAACCCAG	GCCAAGGGCT	TAGGAGGAGG	3603
CCAGGCCCAG	GCTACCCCAC	CCCTCTCAGG	AGCAGAGGCC	GCGTATCACC	ACGACAGAGC	CCCGCGCCGT	3673
CCTCTGCTTC	CCAGTCACCG	TCCTCTGCCC	CTGGACACTT	TGTCCAGCAT	CAGGGAGGTT	TCTGATCCGT	3743
CTGAAATTCA	AGCCATGTCG	AACCTGCGGT	CCTGAGCTTA	ACAGCTTCTA	CTTTCTGTTC	TTTCTGTGTT	3813
GTGGAGACCC	TGAGAAGGAC	CCTGGGAGCT C	TGGGAATTT GG	agtgacca aa	GGTGTGC	;	3872



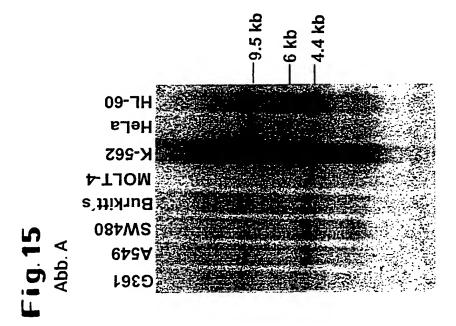
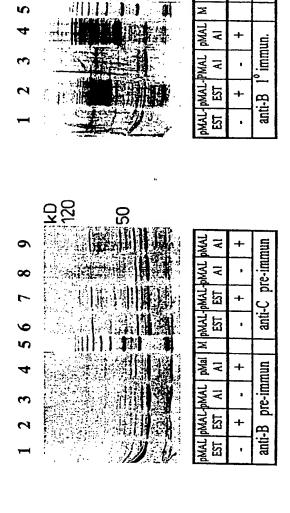
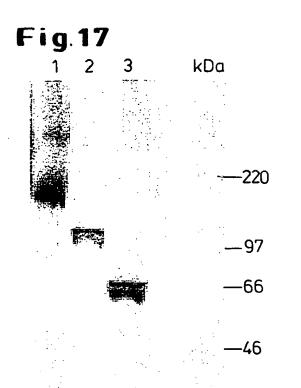


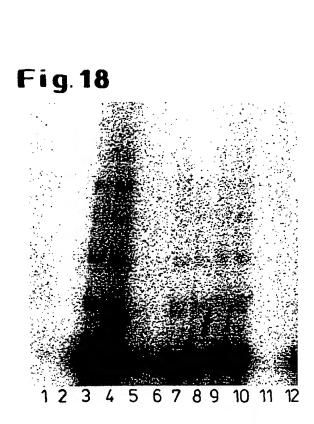
Fig. 16

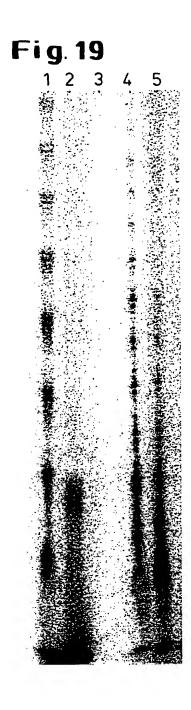
Abb. B



- 15 / 15 -







PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/54, 9/12, A61K 38/45, C07K 16/40, C12Q 1/68, 1/48, C12N 15/11, A 61K 31/70

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/59040

A3

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

30. Dezember 1998 (30.12.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/03468

(22) Internationales Anmeldedatum:

9. Juni 1998 (09.06.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 26 329 1 20. Juni 1997 (20.06.97) DE 198 13 274.3 26. März 1998 (26.03.98) DE 198 16 496.3 14. April 1998 (14.04.98) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAGEN, Gustav [DE/DE]; Walter-Flex-Strasse 32, D-51373 Leverkusen (DE). SIEG-MUND, Hans-Ulrich [DE/DE]; Quettinger Strasse 167, D-51381 Leverkusen (DE). WEICHEL, Walter [DE/DE]; Dhünner Aue 15, D-51519 Odenthal (DE). WICK, Maresa [DE/DE]; Andreas-Gryphius-Strasse 26, D-51065 Köln (DE). ZUBOV, Dmitry [RU/DE]; Roggendorfstrasse 59, D-51061 Köln (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter:

BAYER AKTIENGE-

SELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-22. Juli 1999 (22.07.99)

(54) Title: HUMAN CATALYTIC TELOMERASE SUB-UNIT AND ITS DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE

(54) Bezeichnung: HUMANE KATALYTISCHE TELOMERASE-UNTEREINHEIT UND DEREN DIAGNOSTISCHE UND THERA-PEUTISCHE VERWENDUNG

> MDRADRICHAV ESILESHYER VIPLATFVER IGPOGWRIVO RGDPAAFRAL VAQCLVCVPM DARPPPAAPS FRQVSCLKEL VARVLQRLCE RGAKNVLAPG FALLDGARGG PPEAPTTEVR SYLPNTVTDA LRGSGANGLL LRRVGDDVLV PALLACALPY LYAPSCAYOY COPPLYGLOA ATOARPPERA SOPRELOCE RAMMISYREA GYPLOLPADO AREROGEASE SLPLPKEPER GAAPEPERTP VOQOSWAHPO ETROPEDESF CYVSPARPAE BATSLEGALS OTRHSHDSVO RCHHAGPPST SRPPRPMDTP CPPVYABTRE PLYSSGDERO LEPSPLISSL RPSLTGARRL VETIFLGERP WORDTPERLP RLPCRYWOMR PLFLELLGER ACCPYOVILK THEPLEAAVT PAAGVEAREK POGGVAAPEE EDTDPRELVO LLEGHSSDMQ VYDFVRACIR RLVPPOIMGS REHERFILEE TKKPISLGKH AKLSLGELTW MASVEDCAML RESPOVGEVP AAMERILEET LAKPIHEIMS vyvvellesp pyvtettyck nrlppyvesv wsklosigir chlkryclre Lseaburchr barpalltsr lrpipudcil rpivkodyvv gartyrrekr 600 650 ABBLITERVER LIPSVLEYTERA REPOLLIGASV LOLDDIEBAM RITYVLEVRAQ DPPPELYPVK VOVIGAYDTI PODELITEVIA SIIKPONTYC VERYAVVOKA AHGHVEKAPK SHVSTLIDLO PYNGOFVAHL QETSPLEDAV VIEQSSSLEE ASSGLEDVEL REMCHEAVRI RGKSYVQCQG IPQGSILSTI, LCSLCYGDIG HKLFAGIRRD GLLLRLVDDF LLVTPHLTHA KTFLRTLVRG VPEYGCVVNL RKTVVNPPVB DRALGGTAFV QMPAKGLPPW CGLLLDTRTL EVQSDYSSYA RETSIRASLIP NEGFRAGRAM REKLEGOVERL KCHSLFLDLQ VHSLGTVCTB 1000 ITXILLIQAY RPHACULQLP PHOQUWENDT FPLEVISDTA SLCYBILKAK 1050 HAGNSLGAKG AAGPLPSBAV GWLCHQAPLL KLTHRVTTV PLIGSLRTAQ 1100 TQLSRKLPOT TLTALBAAAN PALPSDPKTI LD

(57) Abstract

The invention relates to the nucleotide sequence and the protein sequence derived therefrom, which encodes for the human catalytic telomerase sub-unit. The invention furthermore relates to methods involving a pharmaceutical, diagnostic or therapeutic use of this gene/protein, principally for treating cancer and ageing.

(57) Zusammenfassung

Diese Erfindung betrifft die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Proteinsequenz, die für die humane katalytische Telomerase-Untereinheit codiert. Darüberhinaus betrifft diese Erfindung Methoden, die eine pharmazeutische, diagnostische oder therapeutische Verwendung von diesem Gen/Protein beinhaltet, vor allem in der Behandlung von Krebs und Alterung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	75 0		• •			
		ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH '	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	0.5	Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen	211	Zinibabwe
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	ıc	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka				
EE	Estland	LR		SE	Schweden		
245	Donaid	LK	Liberia	SG	Singapur		

Int tional Application No PCT/EP 98/03468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/54 C12N C12N9/12 A61K38/45 C07K16/40 C12Q1/68 C1201/48 C12N15/11 A61K31/70 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12Q C07K A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. X WO 96 01835 A (ANDREWS WILLIAM H 1,3, ;VILLEPONTEAU BRYANT (US); FUNK WALTER 10-13 (US); FEN) 25 January 1996 see page 9, line 31 - page 10, line 34 see page 55, line 22 - page 59, line 3 see claims Α WO 96 19580 A (COLD SPRING HARBOR LAB 1 - 13GREIDER CAROL (US); COLLINS KATHLEEN (US);) 27 June 1996 see examples 8-10 Α WO 96 40868 A (COLD SPRING HARBOR LAB 1 ; GREIDER CAROL (US); AUTEXIER CHANTAL (US)) 19 December 1996 see page 8, line 15 - page 9, line 27 see example 1 -/--Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are tisted in annex. Special categories of cited documents : "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report 7 December 1998 22/12/1998 Name and mailing address of the ISA Authorized officer European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016 Andres, S

Int tional Application No
PCT/FP 98/03468

(Continu	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	PCT/EP 98/03468
ategory °		Relevant to claim No.
A	GREIDER C W: "TELOMERE LENGTH REGULATION" ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, vol. 65, 1996, pages 337-365, XP002056801	
Ρ,Χ	WO 98 14593 A (ANDREWS WILLIAM H; CECH THOMAS R (US); MORIN GREGG B (US); NAKAMUR) 9 April 1998 See SEQ IDS 1,2,117,119,140 and 613 see page 27, line 30 - page 52, line 14 see page 72, line 14 - page 79, line 8 see page 91, line 5 - page 105, line 7 see page 114, line 1 - page 158, line 16 see examples	1-13
Р,Х	WO 98 21343 A (AMGEN CANADA INC ;AMGEN INC (US)) 22 May 1998 see figure 9 see page 68, line 32 - page 95, line 5 see claims	1-13
Ρ,Χ	NAKAMURA T M ET AL: "TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT HOMOLOGS FROM FISSION YEAST AND HUMAN" SCIENCE, vol. 277, 15 August 1997, pages 955-959, XP002056803 see the whole document	1-4,7, 10-13
P,X	MEYERSON M ET AL: "HEST2, THE PUTATIVE HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT GENE, IS UP-REGULATED IN TUMOR CELLS AND DURING IMMORTALIZATION" CELL, vol. 90, no. 4, 22 August 1997, pages 785-795, XP002056804 see the whole document	1-4,7, 10-13
P,X	KILIAN, A. ET AL.: "Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types." HUMAN MOLECULAR GENETICS., vol. 6, 12 November 1997, pages 2011-2019, XP002086926 OXFORD GB see the whole document	1-4,7,10
Ρ,Χ	WO 98 01543 A (TULARIK INC) 15 January 1998 see the whole document	1,3,10, 13

Int Jonel Application No PCT/EP 98/03468

C /Comtlean	Minn) DOCUMENTS CONCIDENCE TO BE BELLIANT	J	PCI/EP 98/03468				
Category °	Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT agory * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.						
	φ. · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		riolovani w dann rio.				
	WO 98 37181 A (COUNTER CHRISTOPHER M; WEINBERG ROBERT A (US); WHITEHEAD BIOMEDICA) 27 August 1998 see page 37, line 22 - page 58, line 16 see figure 2		1-13				
; ;							

information on patent family members

Int Ional Application No PCT/EP 98/03468

	atent document d in search repo	rt	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO	9601835	Α	25-01-1996	US	5583016	Δ	10-12-1996
	7001000	• • •	20 01 1770	ÜS	5776679		07-07-1998
				AU	696702		
				AU			17-09-1998
					2964795		09-02-1996
				AU	3095095		09-02-1996
				BG	101103		31-10-1997
				BR	9508254		23-12-1997
				CA	2194393		25-01-1996
				CN	1158617		03-09-1997
				CN	1168696		24-12-1997
				CZ	9700034		15-10-1997
				EP	0778842		18-06-1997
				EP	0793719		10-09-1997
				FI	970026	Α	03-03-1997
				JP	10505488	T	02-06-1998
				JP	10507067	T	14-07-1998
			•	NO	970041	Α	06-03-1997
				PL	318169		26-05-1997
	-			WO	9601614	A	25-01-1998
				US	5837857		17-11-1998
WO	9619580	Α	27-06-1996	EP	0799315	Α	08-10-1997
WO	9640868	Α	19-12-1996	AU	6102296	A	30-12-1996
				CA	2221602	Α	19-12-1996
				EP	0832190		01-04-1998
WO	9814593	Α	09-04-1998	AU	4803697	A	24-04-1998
				AU	4807397	Α	24-04-1998
				DE	19743497	Α	20-08-1998
				DE	841396		24-09-1998
				EP	0841396		13-05-1998
				FR	2757177		19-06-1998
	•			GB	2317891		08-04-1998
				GB	2321642		05-08-1998
				JР	10234384		08-09-1998
		_		WO	9814592		09-04-1998
WO	9821343	Α	22-05-1998	AU	5264498	A	03-06-1998
WO	9801543	Α	15-01-1998	US	5747317	Α	05-05-1998
				AU	3882997		02-02-1998
WO	9837181		27-08-1998	NONE			

Int dionales Aktenzeichen PCT/EP 98/03468

			
A. KLASSI IPK 6	ifizierung des anmeldungsgegenstandes C12N15/54 C12N9/12 A61K38/ C12Q1/48 C12N15/11 A61K31/		C12Q1/68
	nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kl	assifikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE		
IPK 6	ofter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymb C12N C12Q C07K A61K		
	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s		
Während de	er Internationalen Recherche konsuttierte elektronische Datenbank (i	Name der Datenbank und evtl. v	erwendete Suchbegriffe)
	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab	be der in Betracht kommenden Te	elle Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 01835 A (ANDREWS WILLIAM H;VILLEPONTEAU BRYANT (US); FUNK (US); FEN) 25. Januar 1996 siehe Seite 9, Zeile 31 - Seite 34 siehe Seite 55, Zeile 22 - Seite 3 siehe Ansprüche	WALTER 10, Zeile	1,3, 10-13
Α	WO 96 19580 A (COLD SPRING HARBOF; GREIDER CAROL (US); COLLINS KATH (US);) 27. Juni 1996 siehe Beispiele 8-10	R LAB HLEEN -/	1-13
X Weite	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentra	mille
"A" Veröffen aber nik "E" älteree E Anmelc "L" Veröffen scheine anderei soll ode ausgeff "O" Veröffen eine Be "P" Veröffen dem be Datum des A	ntlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, enutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht tillichung, die vor dem internationalen Anmeldadatum, aber nach	oder dem Priontatsdatum ve Anmeldung nicht kollidiert, s Erfindung zugrundellegende Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besond kann allein aufgrund dieser "Y" Veröffentlichung von besond kann nicht als auf erfinderisc werden, wenn die Veröffentlich	erer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung cher Tätigkeit beruhend betrachtet lichung mit einer oder mehreren anderen ategorie in Verbindung gebracht wird und Fachmann nahellegend ist I derselben Patentfamilie ist
Name und Po	ostanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Bevollmächtigter Bediensteit Andres, S	ler

Int .tionales Aktenzeichen
PCT/EP 98/03468

		PCT/EP 9	8/03408
<u> </u>	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	nden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 40868 A (COLD SPRING HARBOR LAB; GREIDER CAROL (US); AUTEXIER CHANTAL (US)) 19. Dezember 1996 siehe Seite 8, Zeile 15 - Seite 9, Zeile 27 siehe Beispiel 1		1
A	GREIDER C W: "TELOMERE LENGTH REGULATION" ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, Bd. 65, 1996, Seiten 337-365, XP002056801		
P,X	WO 98 14593 A (ANDREWS WILLIAM H; CECH THOMAS R (US); MORIN GREGG B (US); NAKAMUR) 9. April 1998 siehe SEQ IDs 1,2,117,119,140 und 613 siehe Seite 27, Zeile 30 - Seite 52, Zeile 14 siehe Seite 72, Zeile 14 - Seite 79, Zeile 8	,	1-13
	siehe Seite 91, Zeile 5 - Seite 105, Zeile 7 siehe Seite 114, Zeile 1 - Seite 158, Zeile 16 siehe Beispiele		
Ρ,Χ	WO 98 21343 A (AMGEN CANADA INC ;AMGEN INC (US)) 22. Mai 1998 siehe Abbildung 9 siehe Seite 68, Zeile 32 - Seite 95, Zeile 5 siehe Ansprüche		1-13
),X	NAKAMURA T M ET AL: "TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT HOMOLOGS FROM FISSION YEAST AND HUMAN" SCIENCE, Bd. 277, 15. August 1997, Seiten 955-959, XP002056803 s1ehe das ganze Dokument		1-4,7, 10-13
P, X	MEYERSON M ET AL: "HEST2, THE PUTATIVE HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT GENE, IS UP-REGULATED IN TUMOR CELLS AND DURING IMMORTALIZATION" CELL, Bd. 90, Nr. 4, 22. August 1997, Seiten 785-795, XP002056804 siehe das ganze Dokument		1-4,7, 10-13
	-/		

In itionales Aktenzeichen
PCT/EP 98/03468

	A CONTRACT OF A	PCT/EP 9	8/03468
Fortsetz legorie°	zung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angebe der in Betracht komm	enden Teile	Betr. Anspruch Nr.
J			Total Calopi world 141.
, χ	KILIAN, A. ET AL.: "Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types." HUMAN MOLECULAR GENETICS., Bd. 6, 12. November 1997, Seiten 2011-2019, XP002086926 OXFORD GB siehe das ganze Dokument		1-4,7,10
Ρ,Χ	WO 98 01543 A (TULARIK INC) 15. Januar 1998 siehe das ganze Dokument		1,3,10, 13
E	WO 98 37181 A (COUNTER CHRISTOPHER M; WEINBERG ROBERT A (US); WHITEHEAD BIOMEDICA) 27. August 1998 siehe Seite 37, Zeile 22 - Seite 58, Zeile 16 siehe Abbildung 2		1-13

Angaben zu Veröffentlich... $_{\rm J}$ en, die zur selben Patentfamilie gehören $_{\rm f}$

In tionales Aktenzeichen
PCT/EP 98/03468

lm F	Recherchenberich		Datum der	NA:	tglied(er) der		Datum der
angeführtes Patentdokument		Veröffentlichung		atentfamilie		Veröffentlichung	
WO 9601835 A		25-01-1996	U\$	5583016	Α	10-12-1996	
				US	5776679	Α	07-07-1998
				AU	696702	В	17-09-1998
				AU	2964795	Α	09-02-1996
				AU	3095095	Α	09-02-1996
				BG	101103		31-10-1997
				BR	9508254	Α	23-12-1997
				CA	2194393		25-01-1996
				CN	1158617		03-09-1997
				CN	1168696		24-12-1997
				ĊŻ	9700034		15-10-1997
				ĒΡ	0778842		18-06-1997
				ĒΡ	0793719		10-09-1997
				FΙ	970026		03-03-1997
				JP	10505488		02-06-1998
				JP	10507067		14-07-1998
				NO	970041		06-03-1997
				PL	318169		26-05-1997
				WO	9601614		25-01-1998
				US	5837857		17-11-1998
	0610500		27 06 1006				
WU	9619580	A	27-06-1996 	EP	0799315	A 	08-10-1997
WO	9640868	Α	19-12-1996	AU	6102296		30-12-1996
				CA	2221602		19-12-1996
				EP	0832190	Α	01-04-1998
WO	9814593	Α	09-04-1998	AU	4803697		24-04-1998
				AU	4807397		24-04-1998
				DE	19743497		20-08-1998
				DE	841396		24-09-1998
				EP	0841396		13-05-1998
				FR	2757177		19-06-1998
			•	GB	2317891		08-04-1998
				GB	2321642		05-08-1998
				JP	10234384		08-09-1998
				WO	9814592	A 	09-04-1998
WO	9821343	Α	22-05-1998	AU	5264498	A	03-06-1998
WO	9801543	Α	15-01-1998	US	5747317		05-05-1998
				AU	3882997	A	02-02-1998
WO	9837181	A	27-08-1998	KEIN	F		